

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> :</b> <b>C12N 15/12, C07K 14/47, 19/00</b>	<b>A2</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/42179</b>  <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 20. Juli 2000 (20.07.00)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP00/00029 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 5. Januar 2000 (05.01.00)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 199 00 743.8      12. Januar 1999 (12.01.99)      DE  <b>(71) Anmelder:</b> AVENTIS PHARMA DEUTSCHLAND GMBH [DE/DE]; Brüningstrasse 50, D-65929 Frankfurt am Main (DE).  <b>(72) Erfinder:</b> JEROME, Valerie; Gartenstr. 17, D-35091 Cölbe (DE). SEDLACEK, Hans-Harald; Sonnenhang 3, D-35041 Marburg (DE). MÜLLER, Rolf; Poitiersstrasse 8, D-35037 Marburg (DE).		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
<b>(54) Title:</b> NOVEL COMPLEX-FORMING PROTEINS <b>(54) Bezeichnung:</b> NEUE KOMPLEXBILDENDE PROTEINE <b>(57) Abstract</b> <p>The invention relates to a complex comprised of unnaturally occurring, specifically complex-forming proteins containing the following components: a) at least one ligand which is specific for a target structure; b) at least one protein containing a mutated dimerization domain, whereby the mutated dimerization domain has been derived by mutating a naturally occurring dimerization domain, said mutated dimerization domain being able to specifically interact with component c), and component b) is covalently bound to component a); c) at least one protein containing a mutated dimerization domain, whereby the mutated dimerization domain has been derived by mutating a naturally occurring dimerization domain, said mutated dimerization domain being able to specifically interact with component b), and component c) is covalently bound to component d), and; d) at least one effector. The invention also relates to the utilization and production of these complexes as well as to nucleic acid constructs which code for said proteins and to the use thereof.</p> <b>(57) Zusammenfassung</b> <p>Die Erfindung bezieht sich auf einen Komplex aus nicht natürlich vorkommenden, spezifisch komplexbildenden Proteinen enthaltend folgende Komponenten: a) mindestens ein für eine Zielstruktur spezifischer Ligand, b) mindestens ein Protein enthaltend eine mutierte Dimerisierungsdomäne, wobei die mutierte Dimerisierungsdomäne durch Mutierung von einer natürlich vorkommenden Dimerisierungsdomäne abgeleitet worden ist, diese mutierte Dimerisierungsdomäne spezifisch mit Komponente c) wechselwirken kann und die Komponente b) kovalent mit der Komponente a) verbunden ist, c) mindestens ein Protein enthaltend eine mutierte Dimerisierungsdomäne, wobei die mutierte Dimerisierungsdomäne durch Mutierung von einer natürlich vorkommenden Dimerisierungsdomäne abgeleitet worden ist, diese mutierte Dimerisierungsdomäne spezifisch mit Komponente b) wechselwirken kann und die Komponente c) kovalent mit der Komponente d) verbunden ist, und d) mindestens einen Effektor. Desweiteren bezieht sich die Erfindung auf die Verwendung und Herstellung dieser Komplexe sowie Nukleinsäurekonstrukte kodierend für die genannten Proteine und deren Verwendung.</p>		

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	IJ	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

## Neue komplexbildende Proteine

### 1. Einleitung

Komplexverbindungen zwischen Proteinen sind in der Natur weit verbreitet.

Grundsätzlich können diese Proteine folgenden Gruppen zugeordnet werden:

- Antikörper, welche mit ihrer Antigenbindestelle spezifisch an das korrespondierende Epitop eines Antigens (welches auch ein anderer Antikörper sein kann) binden können
- Proteinkomplexe, wie sie beispielsweise bei der Aktivierung des Gerinnungssystems oder des Komplementsystems vorkommen
- Liganden-Rezeptorinteraktionen der unterschiedlichsten Art, beispielsweise
  - \* von Antigenen oder deren Epitopen mit dem T-Zell- oder B-Zell-Rezeptor
  - \* von Wachstumsfaktoren, Cytokinen, Chemokinen, Peptidhormonen, Steroidhormonen und Mediatoren mit ihren jeweiligen Rezeptoren
  - \* von Enzymen wie beispielsweise uPA oder tPA mit ihrem Rezeptor
  - \* von Virusproteinen mit ihrem zugehörigen zellulären Rezeptor
- Adhäsionen zwischen Adhäsionsmolekülen
- Proteinkomplexe bei der Signalübertragung, der Zellzykluskontrolle und der Transkriptionskontrolle von Genen

Zahlreiche Beispiele hierfür sind in der Literatur zusammengefaßt, so von Hardie et al., The Protein Kinase Facts Book I and II, Academic Press 1995, Callard et al., The Cytokine Facts Book, Academic Press 1994, Pigott et al., The Adhesion Molecule Facts Book, Academic Press 1994, Barclay et al., The Leukocyte Antigen Facts Book, Academic Press 1994, Watson et al., G-Protein Linked Receptor Facts Book, Academic Press 1994, Hesketh, The Oncogene Facts Book, Academic Press 1995, Leid et al., Cell 68, 377 (1992), Murre et al., Cell 58, 537 (1989), Bbeneza et al., Cell

61, 49 (1990), Brugge, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 123, 1 (1981), Callebaut et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 6270 (1992), Nadeau et al., J. Biol. Chem. 268, 1479 (1993), Burbach et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 8185 (1992), Hoffman et al., Science 252, 954 (1991), Stress-induced Proteins, M.L. Pardue, J.R. Feramisco and S. Lindquist Ed, A.R. Liss, New York (1989), Eukaryotic Transcription Factor, D.S. Lachman, Academic Press (1991), Transcriptional Regulations, Eds. S. McKnight and K.R. Yamamoto, CSHL Press, Cold Spring Harbor, New York (1992).

In einigen Fällen werden die von der Natur vorgegebenen, weitgehend spezifischen Verbindungen zwischen mindestens zwei Proteinen benutzt für die Analyse bzw. Detektion von Proteinen bei der Diagnose von Krankheiten (siehe hierzu EP 0 491 362 B1) und die Bindungspartner solcher Proteine für die Prophylaxe oder Therapie von Erkrankungen. Steht ein Partner der jeweiligen Proteinkomplexe zur Verfügung, kann mit Hilfe dieses Partners die Menge des zweiten oder weiterer Partner, seien es beispielsweise Komplement- oder Gerinnungsfaktoren, Antigene, Rezeptoren oder Signalproteine ermittelt werden. Darüber hinaus werden spezifische Proteinkomplexe benutzt für die Suche nach kleinmolekularen Aktivatoren oder Inhibitoren. Des weiteren werden gereinigte Antikörper oder Liganden für Rezeptoren, wie beispielsweise Cytokine und Peptidhormone, für die Prophylaxe oder Therapie von Erkrankungen Patienten oder Tieren verabreicht.

Bei diesen unterschiedlichen Anwendungsmöglichkeiten für Proteine, die Proteinkomplexe bilden, ist von entscheidender Bedeutung die Spezifität, mit welcher die jeweiligen Proteine eine Komplexbildung eingehen, des weiteren die Verbreitung der jeweiligen Proteine im Organismus. Je geringer die Spezifität ist, um so häufiger werden unspezifische Bindungen eines Partners mit fremden Proteinen auftreten.

Beispielsweise sind unspezifische, d.h. unerwünschte Komplexbildungen mit fremden Proteinpartnern bekanntermaßen das wesentliche Problem der Analytik und Diagnose mit Antikörpern. Unerwünschte Komplexbildungen mit fremden Proteinpartnern können auch in vivo die Ursache für Nebenwirkungen beispielsweise

nach Injektion von Antikörpern sein. Des weiteren ist die spezifische ausschließliche Bindung zwischen zwei Proteinen eine wesentliche Voraussetzung für die Herstellung und spezifische Funktionsweise von komplexen Transkriptionsfaktoren, insbesondere von künstlichen Transkriptionsfaktorkomplexen, wie sie in der Patentanmeldung EP-A 0 805 209 beschrieben wurden.

Es besteht somit ein erheblicher Bedarf an neuen, hochspezifisch, nicht mit fremden Partnern reagierenden komplexbildenden Proteinen.

## 2. Kurzbeschreibung der Erfindung

Gegenstand der Erfindung ist ein Komplex aus nicht natürlich vorkommenden, spezifisch komplexbildenden Proteinen, dadurch gekennzeichnet, daß folgende Komponenten im Komplex enthalten sind:

- a) mindestens ein für eine Zielstruktur spezifischer Ligand,
- b) mindestens ein Protein enthaltend eine mutierte Dimerisierungsdomäne, wobei die mutierte Dimerisierungsdomäne durch Mutierung von einer natürlich vorkommenden Dimerisierungsdomäne abgeleitet worden ist, diese mutierte Dimerisierungsdomäne spezifisch mit Komponente c) wechselwirken kann und die Komponente b) kovalent mit der Komponente a) verbunden ist,
- c) mindestens ein Protein enthaltend eine mutierte Dimerisierungsdomäne, wobei die mutierte Dimerisierungsdomäne durch Mutierung von einer natürlich vorkommenden Dimerisierungsdomäne abgeleitet worden ist, diese mutierte Dimerisierungsdomäne spezifisch mit Komponente b) wechselwirken kann und die Komponente c) kovalent mit der Komponente d) verbunden ist, und
- d) mindestens einen Effektor.

Entsprechend der Erfindung sind die Komponenten b) und c) dadurch charakterisiert, daß in natürlich vorkommenden Peptiden oder Proteinen gleicher oder unterschiedlicher Art Aminosäuren ausgetauscht oder eingefügt werden, so daß die so mutierten Peptide oder Proteine praktisch nur noch ausschließlich miteinander komplexieren können. Eine Komplexbildung so mutierter Peptide oder Proteine mit den entsprechenden nichtmutierten Wildtyp-Proteinen oder -Peptiden unterbleibt hingegen. Auf diese Weise können Homodimere oder Heterodimere aus mutierten Monomeren (mutierte Peptide oder Proteine) gebildet werden.

Die Mutationen in den Bindungsdomänen der gleichen oder verschiedenen Proteine haben daher den Zweck, die Fähigkeit zur Komplexbildung zwischen einem unmutierten Monomeren und einem mutierten Monomeren eines Paares gleicher oder verschiedener Proteine oder Peptide, die im unmutierten Zustand komplexieren würden, zu verhindern. Gleichzeitig verleihen die Mutationen einem solchen Paar von mutierten Proteinen die Fähigkeit, mit hoher Spezifität aneinander zu binden. Die Mutationen treten also paarweise auf, wobei eine Mutation in Komponente b), die andere in Komponente c) vorliegt, und zwar so, daß eine molekulare Interaktion zwischen den jeweiligen Aminosäuren eines solchen Paares möglich ist.

Aminosäuren gemäß der Erfindung eingefügt in natürlich vorkommende Peptide oder Proteine können beispielsweise sein (die paarweise Auflistung soll die molekulare Interaktion im Rahmen eines dimeren Proteinkomplexes andeuten):

Komponente b) oder c)

Komponente c) oder b)

3-18 Cysteine

3-18 Cysteine

3-24 basische Aminosäuren wie

3-24 saure Aminosäuren wie

Histidin,

Asparagin,

Arginin,

Asparaginsäure,

Lysin

Glutamin,

Glutaminsäure

3-24 hydrophobe Aminosäuren wie

Methionin,

Isoleucin,

Leucin,

Valin

3-24 aromatische Aminosäuren wie

Phenylalanin,

Tyrosin,

Tryptophan

3-24 aromatische Aminosäuren

3-24 aromatische Aminosäuren

Die Ausgangsproteine für Komponenten b) und c) können hierbei gleich oder unterschiedlich sein.

Die Bindungskonstante eines Komplexes zweier erfindungsgemäßer Proteine beträgt mindestens  $K_M = 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ , bevorzugt mindestens  $K_M = 10^{-8} \text{ mol l}^{-1}$ .

Im Sinne dieser Erfindung werden beispielsweise folgende gleiche oder ungleiche Partner (für die Herstellung von Komponente b) oder c) und mit dem Ziel Heteromere zu binden) bevorzugt in ihrer jeweiligen Bindedomäne mutiert und diese oder das gesamte Protein verwendet:

Komponente b) oder c)

Komponente c) oder b)

Fos

Jun oder Jun B oder Jun D

FRAU-1

Jun oder Jun B oder Jun D

FRAU-2

Jun oder Jun B oder Jun D

FOS-B

Jun oder Jun B oder Jun D

OCT-1

Jun oder Jun B oder Jun D

NFKB (p65)

IKB

Ras

RAF

CD4

p56LcK

bcl-2

bad oder bax

cyclin A

cdk1

E2F

DP

CD40	CD40L
Myc	Max
Myc N	Max
Myc L	Max
p105 (Rb1)	AFF-2, E1A
p107 (Rb2)	E7, E2F oder Myc
p130	E7, E2F oder Myc
CBL	Gag
TRP	TRP
Met	Met
Myb	p67 oder p160
VAV	p67 oder p160
APC	$\alpha$ - oder $\beta$ -Catenin
APC	APC
VD Rezeptor	h-(Retinoid x-Rezeptor)RXR $\alpha$ oder $\beta$
T3 Rezeptor	hRXR $\alpha$ oder $\beta$
MyoD	E12
Komponente b) oder c)	Komponente c) oder b)
E12	Id
E47	Id
hHSP90	Progesteron-Rezeptor
hHSP90	Glucocorticoid-Rezeptor
hHSP90	Mineralocorticoid-Rezeptor
hHSP90	Dioxinrezeptor
Dioxinrezeptor	Arnt
HPS90	FKBP59
HSP90	Cyclosporin-bindendes Protein
HPS90	pp60 <sup>V-src</sup>
HSP70	HSF1 Heat shock Faktor 1
HSP70	HSF2 Heat shock Faktor 2



Bevorzugt werden sollten solche Proteinpaare, welche natürlicherweise über eine Helix-Loop-Helix/Leucin-Zipper-Bindesequenz verfügen.

Gegenstand der Erfindung sind des weiteren die unterschiedlichsten Verwendungen dieser erfindungsgemäßen komplexbildenden Proteine, beispielsweise

- als multivalente Proteinkomplexe für die Prophylaxe und Therapie
- als multivalente Liganden für Vektoren zur Gentherapie
- als künstliche Transkriptionsfaktoren für die Kontrolle der Expression von Genen
- und als diagnostische oder analytische Systeme.

Hierbei werden die Komponenten a) und d) je nach der gewählten Verwendungsart ausgewählt.

Gegenstand der Erfindung sind besonders neue komplexbildende Proteine, dadurch charakterisiert, daß in natürlicherweise Homodimere oder Heterodimere bildenden Proteinen die aufgeführten Aminosäuren eingefügt worden sind, so daß diese derartig mutierten Proteine (Komponenten b) und c)) nur noch mit sich selber (Homodimere) oder mit dem entsprechend mutierten Partner (Heterodimere) Komplexe bilden, jedoch nicht mehr mit den natürlicherweise vorkommenden, nicht mutierten Ausgangsproteinen.

Neue komplexbildende Proteine mit den Komponenten a), b), c) und d) können in beispielsweise zwei Ausführungsformen verwendet werden.

In der ersten Ausführungsform (siehe Figur 1 a) stellt die Komponente b) ein Homo- (oder Hetero-)multimer dar  $[ \text{Komponente b})_1\text{-b})_n ]$ , an welche die jeweils korrespondierenden gleichen (oder unterschiedlichen) Komponenten c) jeweils als Monomer und jeweils verbunden mit der Komponente d) binden.

Mit dieser Ausführungsform werden viele Komponenten d) (Effektoren) an die Zielstruktur gebunden.

In der zweiten Ausführungsform (siehe Figur 2) stellen sowohl die Komponente b) als auch die Komponente c) Multimere dar, wobei an die Komponente c) nur eine oder wenige Komponenten d) gebunden sind. Mit dieser Ausführungsform werden zwar nur wenige Komponenten d) (Effektoren) an die Zielstruktur gebunden, aber die Bindung zwischen den Komponenten c) und d) ist außerordentlich stark, was die Spezifität der Bindung der Komponenten c) und d) an die Zielstruktur erhöhen kann.

Gegenstand der Erfindung sind neue, komplexbildende Proteine bestehend aus den Komponenten a), b), c) und d), wie auch Nukleinsäurekonstrukte, welche für diese komplexbildenden Proteine kodieren. Ebenfalls Gegenstand der Erfindung sind Komplexe bestehend aus den Komponenten d), b), c) und d), d. h. die Komponente a) ist durch d) ersetzt, und dafür kodierende Nukleinsäurekonstrukte.

Desweiteren ist Gegenstand der Erfindung ein Komplex bestehend aus den Komponenten a), b), c) und a); d. h. die Komponente d) ist durch a) ersetzt, und dafür kodierende Nukleinsäurekonstrukte.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind auch komplexbildende Proteine bestehend aus den Komponenten a), b), c) und d) oder oben beschriebenen Varianten davon, die zusätzlich ein fusiogenes Peptid, ein Translokationspeptid oder zwischen den Komponenten c) und d) oder a) und b) eine Spaltsequenz für eine Protease enthalten, und dafür kodierende Nukleinsäurekonstrukte.

Alle solchen derartigen Nukleinsäurekonstrukte können in Bakterien, Hefen oder Säugerzellen mit Hilfe von viralen oder nichtviralen, dem Fachmann bekannten Vektoren eingeführt werden.

Derartige Zellen können der Herstellung des erfindungsgemäßen Proteins dienen oder selbst zum Zwecke der Prophylaxe oder Therapie einem Organismus verabreicht werden.

Derartige Nukleinsäurekonstrukte, eingefügt in einen Vektor, können jedoch auch direkt einem Organismus zum Zwecke der Prophylaxe oder Therapie verabreicht werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Herstellung einer der o. g. Komplexe, in dem ein Protein dieses Komplexes mit Hilfe eines dafür kodierenden Nukleinsäurekonstruktes exprimiert wird und ein weiteres Protein dieses Komplexes, welches von ersterem verschieden ist, mit Hilfe eines dafür kodierenden Nukleinsäurekonstruktes exprimiert wird, die exprimierten Proteine isoliert und miteinander komplexiert werden. Im Falle von Komplexen bestehend aus Homodimeren oder Homooligomeren erfolgt die Herstellung ohne die Expression eines zweiten, vom ersten verschiedenen Protein.

### 3. Multivalente Proteinkomplexe für die Prophylaxe und Therapie

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Proteinkomplexe für die Prophylaxe oder Therapie einer Erkrankung. Hierbei stellt die Komponente a) einen Liganden für eine Zielstruktur dar. Diese Zielstruktur kann auf einer Zellmembran, in der extrazellulären Matrix oder in einer Gewebe- oder Blutflüssigkeit vorhanden sein.

Gemäß der Erfindung kann die Komponente a) darstellen

- einen Liganden für einen zellulären Rezeptor, beispielsweise
  - \* Wachstumsfaktoren wie VEGF, PDGF, EGF, TGF $\alpha$ , TGF $\beta$ , KGF, SDGF, FGF, IGF, HGF, NGF, BDNF, Neurotrophine, BMF, Bombesin, M-CSF, Thrombopoietin, Erythropoietin, SCF, SDGF, Oncostatin, PDEGF, Endothelin-1
  - \* Cytokine wie IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15
  - \* Interferon  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$
  - \* Tumornekrosefaktoren TNF $\alpha$ , - $\beta$

- \* Chemokine wie RANTES, MCAF, MIP-1 $\alpha$  oder - $\beta$ , NAP,  $\beta$ -Thromboglobulin
- \* Peptidhormone wie SRH, SIH oder STH, MRH oder MSH, PRH, PIH oder Prolaktin, GnRH, LH-RH, FSH-RH, LH/ICSH oder FSH, TRH oder TSH, CRH oder ACTH
- \* Angiotensin, Kinine, Histamin, Homologe oder Analoge hiervon
- \* Steroidhormone wie Östrogene, Gestagene, Androgene, Glukokortikoide, Mineralokortikoide, Homologe oder Analoge hiervon
- \* Vitamine wie z.B. Folsäure

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung kann die Komponente a) auch ein Adhäsionsmolekül, ein Teil des Adhäsionsmoleküls oder ein Analogon eines Adhäsionsmoleküls sein, welches an ein korrespondierendes zellmembranständiges Adhäsionsmolekül oder an eine andere spezifische Bindestruktur für ein Adhäsionsmolekül auf der Zielzelle bindet.

Derartige als Komponente a) funktionsfähige Adhäsionsmoleküle sind beispielsweise

- Lewis X (für GMP-140)
- S-Lewis X (für ELAM-1).
- LFA-1 (für ICAM-1 und ICAM-2)
- MAC-1 (für ICAM-1)
- VLA-4 (für VCAM-1)
- PECAM (für PECAM)
- Vitronectin (für den Vitronectinrezeptor)
- GMP-140 (für Lewis X)
- S-Lewis X (für ELAM-1)
- ICAM-1, ICAM-2 (für LFA-1, MAC-1)
- VCAM-1 (für VLA-4)
- Fibronectin (für VLA-4)
- Laminin (für VLA-6)
- Fibronectin, Laminin (für VLA-1, VLA-2, VLA-3)
- Fibronectin (für VLA-4)

- Fibrinogen (für GPIIb-IIIa)
- B7 (für CD28)
- CD28 (für B7)
- CD40 (für CD40L)
- CD40L (für CD40)

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung kann die Komponente a) auch ein Protein sein, welches sich mit einem Partnerprotein verbindet und hierdurch an einer biologischen Reaktionskette teilhat, beispielsweise ein Komplementfaktor, ein Gerinnungsfaktor, ein Faktor des Kininsystems, des Fibrinolysesystems oder ein plasmatischer oder zellulärer Enzyminhibitor oder ein plasmatisches oder zelluläres Enzym.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung kann die Komponente a) auch einen Rezeptor für einen der zuvor erwähnten Proteine darstellen.

Im Rahmen der vorliegenden Verbindung kann die Komponente a) auch der extrazelluläre Teil eines Fc-Rezeptors sein (Dougherty et al., Transfusion Science 17, 121 (1996)), an welchem ein Antikörper spezifisch für die Zielzelle über seinen Fc-Teil gebunden wird.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung kann die Komponente a) auch ein Antikörpermolekül oder den epitopbindenden Teil eines Antikörpermoleküls darstellen. Humane Antikörper sind zu bevorzugen.

Die murinen monoklonalen Antikörper können in humanisierter Form eingesetzt werden. Die Humanisierung erfolgt in der von Winter et al. (Nature 349, 293 (1991)) und Hoogenbooms et al. (Rev. Tr. Transfus. Hemobiol. 36, 19 (1993)) dargestellten Weise. Antikörperfragmente werden entsprechend dem Stand der Technik hergestellt, beispielsweise in der von Winter et al., (Nature 349, 293 (1991)), Hoogenboom et al. (Rev. Tr. Transfus. Hemobiol. 36, 19 (1993)), Girol, Mol. Immunol.

28, 1379 (1991)) oder Huston et al. (Int. Rev. Immunol. 10, 195 (1993)) beschriebenen Weise.

Rekombinante Antikörperfragmente werden direkt aus existierenden Hybridomen hergestellt oder werden mit Hilfe der "phage display"-Technologie aus Bibliotheken muriner bzw. humaner Antikörperfragmente isoliert. Diese Antikörperfragmente werden dann auf genetischer Ebene direkt für weitere Manipulationen (z.B. der Fusion mit anderen Proteinen) eingesetzt.

Zur Herstellung von rekombinanten Antikörperfragmenten aus Hybridomen wird die genetische Information, die für die antigenbindenden Domänen (VH, VL) der Antikörper kodiert, durch Isolierung der mRNA, die reverse Transkription der RNA in cDNA und die anschließende Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion und Oligonukleotiden komplementär zu den 5'- bzw. 3'-Enden der variablen Fragmente gewonnen. Die VH- und VL-Fragmente werden dann in bakterielle Expressionsvektoren z.B. in Form von Fv-Fragmenten, einzelkettigen Fv-Fragmenten (scFv) oder als Fab-Fragmente kloniert.

Neue Antikörperfragmente können mittels der "phage-display"-Technologie auch direkt aus Antikörperbibliotheken (Immunbibliotheken, naive Bibliotheken) murinen oder humanen Ursprungs isoliert werden. Beim "phage display" von Antikörperfragmenten werden die antigenbindenden Domänen als Fusionsproteine mit dem Hüllprotein gp3P filamentöser Bakteriophagen entweder in das Phagengenom oder in Phagemid-Vektoren in Form von scFv-Fragmenten oder als Fab-Fragmente kloniert. Antigen-bindende Phagen werden an antigenbeladenen Plastikgefäßen ("panning"), an antigenkonjugierten, paramagnetischen Kügelchen ("beads") oder durch Bindung an Zelloberflächen selektioniert.

Immunbibliotheken werden hergestellt durch PCR-Amplifikation der variablen Antikörperfragmente aus B-Lymphozyten immunisierter Tiere oder Patienten. Dazu werden Kombinationen von Oligonukleotiden die spezifisch sind für murine oder

humane Immunglobulingene bzw. für die humanen Immunglobulin-Genfamilien verwendet.

Unter Verwendung nichtimmunisierter Spender als Quelle der Immunglobulingene lassen sich naive Bibliotheken herstellen. Alternativ können Immunglobulin-Keimbahngene zur Herstellung semisynthetischer Antikörperrepertoires eingesetzt werden, wobei die Komplementarität-bestimmende Region 3 der variablen Fragmente durch PCR mit Hilfe degenerierter Primer ergänzt wird. Diese sogenannten "single pot"-Bibliotheken haben gegenüber Immunbibliotheken den Vorteil, daß Antikörperfragmente gegen eine Vielzahl von Antigenen aus einer einzigen Bibliothek isoliert werden können.

Die Affinität von Antikörperfragmenten kann mittels der "phage display"-Technologie weiter erhöht werden, wobei neu Bibliotheken von bereits existierenden Antikörperfragmenten durch zufällige, kodonbasierende oder gezielte Mutagenese, durch "chain shuffling" einzelner Domänen mit Fragmenten aus nativen Repertoires oder unter Zuhilfenahme von bakteriellen Mutatorstämmen hergestellt werden und durch Reselektion unter stringenten Bedingungen Antikörperfragmente mit verbesserten Eigenschaften isoliert werden. Zusätzlich können murine Antikörperfragmente durch stufenweisen Austausch einer der variablen Domänen gegen ein humanes Repertoire und anschließende Selektion mit dem ursprünglichen Antigen ("guided selection") humanisiert werden. Alternativ erfolgt die Humanisierung muriner Antikörper durch zielgerichteten Austausch der hypervariablen Regionen humaner Antikörper durch die korrespondierenden Regionen des originalen murinen Antikörpers.

Entsprechend der Erfindung können mindestens zwei gleiche oder unterschiedliche Liganden für die Zielstruktur, z.B. auf der Zielzelle im erfindungsgemäßen Liganden (Komponente a) enthalten sein. Eine besondere Form von bispezifischen oder multispezifischen, rekombinanten Antikörpern stellen einzelkettige, zweifach- oder mehrfach-antigenbindende Moleküle dar. Die Herstellung dieser Moleküle wurde in der Patentanmeldung DE 19816141.7 (nicht veröffentlicht) beschrieben. Auf diese

Patentanmeldung wird zur beispielsweise Herstellung der Komponente a) ausdrücklich Bezug genommen.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung kann die Komponente a) auch das Hüllprotein oder ein Teil des Hüllproteins von Viren darstellen, welche über ihr Hüllprotein an ausgewählte Zellen spezifisch binden.

Die Wahl der Komponente a) richtet sich nach der Zielstruktur, an welche das erfindungsgemäße komplexbildende Protein binden soll.

Als Beispiele hierfür gelten:

– Liganden für aktivierte Endothelzellen

Hierzu gehören im Sinne der Erfindung Antikörper oder Antikörperfragmente, gerichtet gegen Membranstrukturen von Endothelzellen wie sie beispielsweise von Burrows et al. (Pharmac. Ther. 64, 155 (1994), Hughes et al. (Cancer Res. 49, 6214 (1989)) und Maruyama et al. (PNAS-USA 87, 5744 (1990)) beschrieben wurden. Insbesondere zählen hierzu Antikörper gegen die VEGF-Rezeptoren.

Zu den Liganden gehören des weiteren alle Wirkstoffe, welche an

Membranstrukturen oder Membranrezeptoren auf Endothelzellen binden.

Beispielsweise gehören hierzu Substanzen, die endständig Mannose enthalten, des weiteren IL-1 oder Wachstumsfaktoren oder deren Fragmente bzw. Teilsequenzen von ihnen, die an Rezeptoren exprimiert durch Endothelzellen binden, wie beispielsweise PDGF, bFGF, VEGF, TGF $\beta$  (Pusztain et al., J. Pathol. 169, 191 (1993)).

Des weiteren gehören hierzu Adhäsionsmoleküle, welche an aktivierte und/oder proliferierende Endothelzellen binden. Derartige Adhäsionsmoleküle, wie beispielsweise Slex, LFA-1, MAC-1, LECAM-1, VLA-4, Vitronectin oder RGD-Peptide wurden bereits beschrieben (Übersichten bei Augustin-Voss et al., J. Cell Biol.



119, 483 (1992), Pauli et al., Cancer Metast. Rev. 9, 175 (1990), Honn et al., Cancer Metast. Rev. 11, 353 (1992)).

Zu den Liganden im Sinne dieser Erfindung gehören insbesondere Glykoproteine der Hülle von Viren, die einen Tropismus für Endothelzellen haben. Zu diesen Viren gehören beispielsweise:

- Filoviren, beispielsweise
  - \* das Marburg-Virus  
mit seinem Hüllprotein GP (glycoprotein) und sGP (second glycoprotein)
  - \* oder das Ebola-Virus  
jeweils mit seinem Hüllprotein GP und sG
- das Cytomegalovirus  
besonders mit seinem gB-Protein
- das Herpes Simplex-Virus Type I
- das HIV-1 Virus
- das Masern-Virus
- das Hantaan-Virus
- Alphaviren, wie Semliki Forest-Virus
- das Virus des epidemischen, haemorrhagischen Fiebers
- das Poliovirus
- Enteroviren (wie z.B. Echo 9, Echo 12, Cocksackie B3)
- Liganden für aktivierte Makrophagen und/oder aktivierte Lymphozyten

Zu den Liganden im Sinne der Erfindung gehören des weiteren Substanzen, welche an die Oberfläche von Immunzellen spezifisch binden. Hierzu gehören Antikörper oder Antikörperfragmente gerichtet gegen Membranstrukturen von Immunzellen, wie sie beispielsweise von Powelson et al. (Biotech. Adv. 11, 725 (1993)) beschrieben wurden.

Des weiteren gehören zu den Liganden auch monoklonale oder polyklonale Antikörper oder Antikörperfragmente, die mit ihrem antigenbindenden variablen Teil an Fc- $\gamma$  - oder Fc- $\epsilon$  - oder Fc- $\mu$  Rezeptoren von Immunzellen binden (Rojanasakul et al., Pharm. Res. 11, 1731 (1994)).

Des weiteren gehört hierzu das Fc-Fragment von humanem monoklonalem oder polyklonalem Immunglobulin. Derartige Fc-Fragmente werden beispielsweise gentechnisch mit Hilfe rekombinierter DNA oder entsprechend der Methoden von Haupt et al. (Klin. Wschr. 47, 270 (1969)), Kranz et al. (Dev. Biol. Standard 44, 19 (1979)), Fehr et al. (Adv. Clin. Pharmac. 6, 64 (1974)) oder Menninger et al. (Immunochem. 13, 633 (1976)) hergestellt.

Zu den Liganden gehören des weiteren alle Substanzen, welche an Membranrezeptoren auf der Oberfläche von Immunzellen binden. Hierzu gehören Zytokine wie beispielsweise IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-10, TNF $\alpha$ , GM-CSF, M-CSF, des weiteren Wachstumsfaktoren wie beispielsweise EGF, TGF, FGF, IGF oder PDGF oder deren Fragmente bzw. Teilsequenzen von ihnen, die an Rezeptoren exprimiert durch Immunzellen binden.

Hierzu gehören des weiteren Adhäsionsmoleküle und andere Liganden, welche an Zellmembranstrukturen, wie beispielsweise an den Mannose 6-Phosphat-Rezeptor auf Makrophagen in Milz, Leber, Lunge und andere Gewebe binden.

Eine Auswahl dieser Liganden und Membranstrukturen sind übersichtlich bei Perales et al. (Eur. J. Biochem. 226, 255 (1994)) beschrieben.

Zu den Liganden im Sinne dieser Erfindung gehören jedoch auch Glykoproteine der Hülle von solchen Viren, die einen Tropismus für Lymphozyten und/oder Makrophagen haben.

Zu diesen Makrophagen infizierenden Viren gehören beispielsweise:

- HIV-1  
besonders solche Stämme mit Mutationen in der V3-Region von gp120, die zu einer erhöhten Bindung an Makrophagen führen
- HIV-2
- Hantaviren, beispielsweise das Puumalavirus
- Cytomegalovirus
- Respiratory Syncytial Virus
- Herpes simplex-Virus
- Filoviren.

Zu den Lymphozyten infizierenden Viren gehören beispielsweise:

- Varizella-Zoster-Virus (VZV);  
VZV infiziert besonders T-Zellen
- Herpes Virus 6 (HHV-6);  
HHV-6 infiziert besonders T-Zellen
- Rabies-Virus;  
das Rabies-Virus Hüllprotein bindet besonders an TH2-Zellen
- HIV-1;  
das Glykoprotein gp120 bindet bevorzugt an das CD4 Molekül von T-Zellen
- HTLV-II;  
HTLV-II infiziert besonders B-Zellen
- HTLV-I;  
HTLV-I infiziert besonders T-Zellen
- Influenza C-Viren;  
Influenza-C-Viren binden über das Haemagglutinin-Esterase-Fusions-(HEF)-Protein an N-acetyl-9- $\beta$ -acetylneuraminsäure (Neu 5,9 Ac), welche bevorzugt auf B-Lymphozyten, weniger oder nicht auf T-Lymphozyten vorkommt
- Influenza C-Viren mit Mutation in der Nukleotidposition 872 (die die Position 284 des HEF der Aminosäuresequenz kodiert), beispielsweise ein Austausch des Threonins durch Isoleucin. Das Oberflächenprotein HEF mit dieser

Mutation hat eine deutlich stärkere Affinität zum N-acetyl-9- $\beta$ -acetylneuraminsäure-Rezeptor als das Wildvirus

- HEF Spaltprodukte des Influenza C-Virus, welche die Bindestruktur für N-acetyl-9- $\beta$ -acetylneuraminsäure enthalten. Diese Bindestruktur ist definiert durch die katalytische Triade Serin-71, Histidin 368 oder - 369 und Asparaginsäure 261
- Epstein-Barr Virus;  
EBV infiziert besonders B-Zellen
- Herpes simplex-Virus-2;  
HSV-2 infiziert besonders T-Zellen
- Masernvirus
- Liganden für Muskelzellen

Hierzu gehören beispielsweise Antikörper oder Antikörperfragmente, gerichtet gegen Membranstrukturen von Muskelzellen, insbesondere von glatten Muskelzellen. Derartige Antikörper sind beispielsweise

- der Antikörper 10F3
- Antikörper gegen Actin
- Antikörper gegen Angiotensin II-Rezeptoren
- Antikörper gegen Rezeptoren für Wachstumsfaktoren  
oder Antikörper gerichtet beispielsweise gegen
- EGF-Rezeptoren
- oder gegen PDGF-Rezeptoren
- oder gegen FGF-Rezeptoren
- oder Antikörper gegen Endothelin A-Rezeptoren.

Zu den Liganden gehören des weiteren alle Wirksubstanzen, welche an Membranstrukturen oder Membranrezeptoren auf Muskelzellen binden (Übersicht bei Pusztai et al., J. Pathol. 169, 191 (1993), Harris, Curr. Opin. Biotechnol. 2, 260

(1991)). Beispielsweise gehören hierzu Wachstumsfaktoren oder deren Fragmente bzw. Teilsequenzen von ihnen, die an Rezeptoren exprimiert durch glatte Muskelzellen binden wie beispielsweise

- PDGF
- EGF
- TGF $\beta$
- TGF $\alpha$
- FGF
- Endothelin A

Zu den Liganden im Sinne dieser Erfindung gehören jedoch auch Glykoproteine der Hülle von solchen Viren, die einen Tropismus für Muskelzellen haben. Zu diesen Viren gehört beispielsweise das Cytomegalovirus.

- Liganden für blutbildende Zellen

Zu den Liganden gehören Antikörper oder Antikörperfragmente, gerichtet gegen Rezeptoren exprimiert auf gering differenzierten Blutzellen.

Derartige Antikörper sind beispielsweise für folgende Rezeptoren beschrieben worden:

- Stem Cell Factor Receptor
- IL-1-Rezeptor (Type I)
- IL-1-Rezeptor (Type II)
- IL-3-Rezeptor  $\alpha$
- IL-3-Rezeptor  $\beta$
- IL-6-Rezeptor
- GM-CSF-Rezeptor.

Des weiteren gehören zu den Liganden auch monoklonale oder polyklonale Antikörper oder Antikörperfragmente, die mit ihren konstanten Domänen an Fc- $\gamma$  Rezeptoren von Immunzellen binden.

Zu den Liganden gehören des weiteren alle Substanzen, welche an Membranstrukturen oder Membranrezeptoren auf der Oberfläche von gering differenzierten Blutzellen binden. Beispielsweise gehören hierzu Wachstumsfaktoren, wie SCF, IL-1, IL-3, IL-6, GM-CSF oder deren Fragmente bzw. Teilsequenzen von ihnen, die an Rezeptoren exprimiert durch Blutzellen binden.

– Liganden für Synovialzellen und Entzündungszellen

Hierzu gehören monoklonale oder polyklonale Antikörper oder Antikörperfragmente, die mit ihren variablen Domänen an Membranstrukturen von Synovialzellen oder Entzündungszellen binden. Solche Membranstrukturen sind beispielsweise

- Vimentin
- Fibronectin oder
- Fc-Rezeptoren.

Hierzu gehören auch monoklonale oder polyklonale Antikörper oder Antikörperfragmente, die mit ihren konstanten Domänen an Fc-Rezeptor binden.

Hierzu gehören des weiteren alle Wirkstoffe, welche an Membranstrukturen oder Membranrezeptoren auf Synovialzellen binden. Beispielsweise gehören hier Cytokine oder Wachstumsfaktoren oder deren Fragmente bzw. Teilsequenzen von ihnen, die an Rezeptoren exprimiert durch Synovialzellen binden wie beispielsweise IL-1-RA, TNF $\alpha$ , IL-4, IL-6, IL-10, IGF, TGF $\beta$ .

Des weiteren gehören hierzu Liganden, deren wesentlicher Bestandteil endständige Mannose ist, welche an Mannose-6-Phosphatrezeptoren auf Makrophagen bindet.

– Liganden für mit Viren infizierte Zellen

Zu den Liganden gehören Antikörper oder Antikörperfragmente, gerichtet gegen die Virusantigene exprimiert auf der Zellmembran von virusinfizierten Zellen.

Derartige Antikörper sind beispielsweise für mit folgenden Viren infizierten Zellen beschrieben worden:

- HBV
- HCV
- HSV
- HPV
- HIV
- EBV
- HTLV.

– Liganden für Leberzellen und weitere Gewebezellen

Zu den Liganden gehören alle Substanzen, welche an Membranstrukturen oder Membranrezeptoren auf der Oberfläche von Leberzellen binden. Beispielsweise gehören hierzu Wachstumsfaktoren, wie Zytokine, EGF, TGF, FGF oder PDGF, oder deren Fragmente bzw. Teilsequenzen von ihnen, die an Rezeptoren exprimiert durch derartige Zellen binden.

Hierzu gehören des weiteren Liganden, welche an Zellmembranstrukturen binden, welche selektiv sind für bestimmte Gewebe. Hierzu zählen beispielsweise:

Membranstruktur	Ligand	Gewebezellen
Asialoglycoprotein-Rezeptor	Asialoorosomucoid Neoglycoprotein Galactose	Leberzellen
Transferrin-Rezeptor	Transferrin	Leber, andere Gewebezellen
Insulin-Rezeptor	Insulin	Leber, andere Gewebezellen
Mannose-6-Phosphat-Rezeptor	Mannose	Makrophagen in Milz, Leber, Lunge, andere Gewebe
Fc- $\gamma$ -Rezeptoren	Immunglobulin G	retikuloendotheliales System, andere Gewebe

Diese Liganden und Membranstrukturen sind übersichtlich bei Perales et al. (Eur. J. Biochem. 226, 255 (1994)) beschrieben.

... Zu den Liganden im Sinne der Erfindung gehören jedoch besonders Glykoproteine der Hülle von Viren, die einen Tropismus für ausgewählte Zellen haben, wie beispielsweise für

- Bronchialepithelzellen
    - \* Respiratory syncytial virus
  - Leberzellen
    - \* Hepatitis C-Virus, Hepatitis B-Virus, Hepatitis A-Virus
    - \* Filoviren
- Leberzellen binden z.B. das Marburg-Virus über den Asialoglycoprotein-Rezeptor



- \* Hepatitis B-Virus  
Leberzellen binden bevorzugt über den Asialoglykoprotein-Rezeptor an der preS2 und preS1 Domäne von HBV
  - \* Hepatitis D-Virus
  - lebersinusoidale Zellen
  - \* Hepatitis V-Virus  
HBV wird gebunden über Fibronectin.
- Liganden für Gliazellen

Hierzu gehören Antikörper oder Antikörperfragmente gerichtet gegen Membranstrukturen von Gliazellen, wie sie beispielsweise von Mirsky et al. (Cell and Tissue Res. 240, 723 (1985)), Coakham et al. (Prog. Exp. Tumor Res. 29, 57 (1985)) und McKeever et al. (Neurobiol. 6, 119 (1991)) berichtet wurden. Zu diesen Membranstrukturen gehören des weiteren Neuraladhäsionsmoleküle wie N-CAM, insbesondere dessen Polypeptidkette C.

Hierzu gehören des weiteren alle Wirkstoffe, welche an Membranstrukturen oder Membranrezeptoren auf Gliazellen binden. Beispielsweise gehören hierzu Substanzen, die endständig Mannose tragen und an den Mannose-6-Phosphatrezeptor binden, Insulin und Insulin-like growth factor, PDGF und diejenigen Fragmente dieser Wachstumsfaktoren, welche an die zugehörigen Membranrezeptoren binden.

Zu den Liganden im Sinne der Erfindung gehören insbesondere Glykoproteine der Hülle von solchen Viren, die einen Tropismus für Gliazellen haben.

Zu diesen Viren gehören beispielsweise:

- HIV-1 Subtyp JRF1
- Herpes simplex-Virus I

– Liganden für Leukämiezellen

Hierzu gehören Antikörper oder Antikörperfragmente, gerichtet gegen Membranstrukturen von Leukämiezellen. Eine große Anzahl derartiger monoklonaler Antikörper sind bereits für diagnostische und therapeutische Verfahren beschrieben worden (Übersichten bei Kristensen, Danish Medical Bulletin 41, 52 (1994); Schranz, Therapia Hungarica 38, 3 (1990); Drexler et al., Leuk. Res. 10, 279 (1986); Naeim, Dis. Markers 7, 1 (1989); Stickney et al., Curr. Opin. Oncol. 4, 847 (1992); Drexler et al., Blut 57, 327 (1988); Freedman et al., Cancer Invest. 9, 69 (1991)). Je nach Typ der Leukämie sind als Liganden beispielsweise monoklonalen Antikörper oder deren antigenbindende Antikörperfragmente mit Spezifität für folgende Antigene geeignet:

Zellen	Membranantigen
AML	CD13
	CD14
	CD15
	CD33
	CAMAL
	Sialosyl-Le
B-CLL	CD5
	CD1c
	CD23
	Idiotypen und Isotypen der Membranimmun- globuline
T-CLL	CD33
	M38
	IL-2-Rezeptoren
	T-Zell-Rezeptoren
ALL	CALLA
	CD19
	Non-Hodgkin Lymphoma

Zu den Liganden gehören des weiteren alle Wirkstoffe, welche an Membranstrukturen oder Membranrezeptoren von Leukämiezellen binden. Beispielsweise gehören hierzu Wachstumsfaktoren oder deren Fragmente bzw.

Teilsequenzen von ihnen, die an Rezeptoren exprimiert durch Leukämiezellen binden.

Derartige Wachstumsfaktoren wurden bereits beschrieben (Übersichten bei Cross et al., Cell 64, 271 (1991); Aulitzky et al., Drugs 48, 667 (1994); Moore, Clin. Cancer Res. 1, 3 (1995); Van Kooten et al., Leuk. Lymph. 12, 27 (1993)).

Beispielsweise gehören zu ihnen:

- IFN $\alpha$  bei Non-Hodgkin Lymphomen
  - IL-2, besonders bei T-Zell-Leukämien
  - FGF bei T-Zell-, monozytären, myeloiden, erythroiden und megakaryoblastischen Leukämien
  - TGF $\beta$  bei Leukämien
  - Retinoide, z.B. "Retinoic acid" bei akuter promyelozytärer Leukämie.
- Liganden für Tumorzellen

Hierzu gehören Antikörper und Fragmente dieser Antikörper, gerichtet gegen Membranstrukturen auf Tumorzellen. Derartige Antikörper wurden zum Beispiel von Sedlacek et al. (Contrib. to Oncol. 32, Karger Verlag, München (1988) und Contrib. to Oncol. 43, Karger Verlag, München (1992)) übersichtlich dargestellt.

Weitere Beispiele stellen dar Antikörper gegen:

- Sialyl Lewis
- Peptide auf Tumoren, welche von T-Zellen erkannt werden
- von Onkogenen exprimierte Proteine
- Ganglioside wie GD3, GD2, GM2, 9-0-acetyl GD3, Fucosyl GM1
- Blutgruppenantigene und deren Vorläufer
- Antigene auf dem polymorphen epithelialen Mucin
- Antigene auf Heat Shock Proteinen

Gemäß der Erfindung kann die Komponente d) entweder fehlen oder ist, je nach Art der Erkrankung, welche verhütet oder behandelt werden soll, gemeinsam mit der Komponente a) beispielsweise wie folgt auszuwählen:

a) Therapie von Tumoren

a.1) Zielzellen:

- proliferierende Endothelzellen oder
- der Endothelzelle benachbarte Stromazellen und Muskelzellen oder
- Tumorzellen oder Leukämiezellen

a.2) Effektoren: Inhibitoren der Zellproliferation, zum Beispiel

- das Retinoblastomprotein (pRb=p110) oder die verwandten p107 und p130 Proteine

Das Retinoblastomprotein (pRb/p110) und die verwandten p107 und p130 Proteine werden durch Phosphorylierung inaktiviert. Bevorzugt sind solche Gene dieser Zellzyklusinhibitoren zu verwenden, welche Mutationen für die Inaktivierungsstellen der exprimierten Proteine aufweisen, ohne daß diese hierdurch in ihrer Funktion beeinträchtigt werden. Beispiele für diese Mutationen wurden beschrieben für das p110. In analoger Weise wird die DNA-Sequenz für das p107 Protein oder das p130 Protein mutiert.

– das p53 Protein

Das Protein p53 wird in der Zelle inaktiviert entweder durch Bindung an spezielle Proteine, wie beispielsweise MDM2, oder durch Oligomerisierung des p53 über das dephosphorylierte C-terminale Serin. Bevorzugt wird somit eine DNA-Sequenz für ein p53 Protein verwendet, welches C-terminal verkürzt ist um das Serin 392.

- das p21 (WAF-1)
- das p16 Protein
- andere cdk-Inhibitoren
- das GADD45 Protein
- das Bak Protein

- das Bax Protein
- a.3) Effektoren: Gerinnung induzierende Faktoren und Angiogeneseinhibitoren, zum Beispiel:
- Plasminogenaktivatorinhibitor-1 (PAI-1)
  - PAI-2
  - PAI-3
  - Angiostatin und/oder Endostatin
  - Interferone (IFN $\alpha$ , IFN $\beta$  oder IFN $\gamma$ )
  - Platelet factor 4
  - IL-12
  - TIMP-1
  - TIMP-2
  - TIMP-3
  - Leukemia Inhibitory Factor (LIF)
  - Tissue Factor (TF) und dessen gerinnungsaktive Fragmente
- a.4) Effektoren: zytostatische und zytotoxische Proteine, zum Beispiel
- Perforin
  - Granzym
  - IL-2
  - IL-4
  - IL-12
  - Interferone, wie beispielsweise IFN- $\alpha$ , IFN $\beta$  oder IFN $\gamma$
  - TNF, wie TNF $\alpha$  oder TNF $\beta$
  - Oncostatin M
  - Sphingomyelinase
  - Magainin und Magainin-Derivate
- a.5) Effektoren: zytostatische oder zytotoxische Antikörper

- Zu den zytostatischen oder zytotoxischen Antikörpern gehören solche gerichtet gegen Membranstrukturen von Endothelzellen wie sie beispielsweise von Burrows et al. (Pharmac. Ther. 64, 155 (1994)), Hughes et al., (Cancer Res. 49, 6214 (1989)) und Maruyama et al., (PNAS USA 87, 5744 (1990)) beschrieben wurden. Insbesondere zählen hierzu Antikörper gegen die VEGF-Rezeptoren.
- Des weiteren gehören hierzu zytostatische oder zytotoxische Antikörper gerichtet gegen Membranstrukturen auf Tumorzellen. Derartige Antikörper wurden zum Beispiel von Sedlacek et al. (Contrib. to Oncol. 32, Karger Verlag, München (1988) und Contrib. to Oncol. 43, Karger Verlag, München (1992)) übersichtlich dargestellt. Weitere Beispiele stellen dar Antikörper gegen Sialyl Lewis; gegen Peptide auf Tumoren, welche von T-Zellen erkannt werden; gegen von Onkogenen exprimierte Proteine; gegen Ganglioside wie GD3, GD2, GM2, 9-0-acetyl GD3, Fucosyl GM1; gegen Blutgruppenantigene und deren Vorläufer; gegen Antigene auf dem polymorphen epithelialen Mucin; gegen Antigene auf Heat Shock Proteinen
- Des weiteren gehören hierzu Antikörper gerichtet gegen Membranstrukturen von Leukämiezellen. Eine große Anzahl derartiger monoklonaler Antikörper sind bereits für diagnostische und therapeutische Verfahren beschrieben worden (Übersichten bei Kristensen, Danish Medical Bulletin 41, 52 (1994); Schranz, Therapia Hungarica 38, 3 (1990); Drexler et al., Leuk. Res. 10, 279 (1986); Naeim, Dis. Markers 7, 1 (1989); Stickney et al., Curr. Opin. Oncol. 4, 847 (1992); Drexler et al., Blut 57, 327 (1988); Freedman et al., Cancer Invest. 9, 69 (1991)). Je nach Typ der Leukämie sind als Liganden beispielsweise monoklonalen Antikörper oder deren antigenbindende Antikörperfragmente gerichtet gegen folgende Membranantigene geeignet:

Zellen	Membranantigen
AML	CD13 CD15 CD33 CAMAL Sialosyl-Le
B-CLL	CD5 CD1c CD23 Idiotypen und Isotypen der Membranimmungoglobuline
T-CLL	CD33 M38 IL-2-Rezeptoren T-Zell-Rezeptoren
ALL	CALLA CD19 Non-Hodgkin Lymphoma

- Die Humanisierung muriner Antikörper, die Herstellung und Optimierung der Gene für Fab und rek. Fv Fragmente erfolgt entsprechend der dem Fachmann bekannten Technik (Winter et al., Nature 349, 293 (1991); Hoogenbooms et al., Rev. Tr. Transfus. Hemobiol. 36, 19 (1993); Girol. Mol. Immunol. 28, 1379 (1991) oder Huston et al., Intern. Rev. Immunol. 10, 195 (1993)). Die Fusion der rek. Fv-Fragmente mit der Komponente b) und/oder Komponente c) erfolgt mit dem dem Fachmann bekannten Stand der Technik durch Expression eines Genes kodierend für das Fusionsprotein.

a.6) Effektoren: Induktoren von Entzündungen, zum Beispiel

- IL-1
- IL-2
- RANTES (MCP-2)
- monocyte chemotactic and activating factor (MCAF)
- IL-8
- macrophage inflammatory protein-1 (MIP-1 $\alpha$ , - $\beta$ )
- neutrophil activating protein-2 (NAP-2)

- IL-3
- IL-5
- human leukemia inhibitory factor (LIF)
- IL-7
- IL-11
- IL-13
- GM-CSF
- G-CSF
- M-CSF
- Cobra venom factor (CVF) oder Teilsequenzen vom CVF, welchem dem menschlichen Komplementfaktor C3b funktionell entsprechen, d.h. welche an den Komplementfaktor B binden können und nach Spaltung durch den Faktor D eine C3 Konvertase darstellen
- der menschliche Komplementfaktor C3 oder seine Teilsequenz C3b
- Spaltprodukte des menschlichen Komplementfaktors C3, welche funktionell und strukturell dem CVF ähneln
- bakterielle Proteine, welche Komplement aktivieren oder Entzündungen auslösen, wie beispielsweise Porine von *Salmonella typhimurium*, "clumping" Faktoren von *Staphylococcus aureus*, Moduline besonders von gram-negativen Bakterien, "Major outer membrane protein" von Legionellen oder von *Haemophilus influenza* Typ B oder von Klebsiellen oder M-Moleküle von Streptokokken Gruppe G.

a.7) Effektoren: Enzyme für die Aktivierung von Vorstufen von Zytostatika, zum Beispiel für Enzyme, welche inaktive Vorsubstanzen (Prodrugs) in aktive Zytostatika (Drugs) spalten.

Derartige Substanzen und die jeweils zugehörigen Prodrugs und Drugs sind bereits von Deonarain et al. (Br. J. Cancer 70, 786 (1994)), Mullen (Pharmac. Ther. 63, 199 (1994) und Harris et al. (Gene Ther. 1, 170 (1994)) übersichtlich beschrieben worden. Beispielsweise ist eines der folgenden Enzyme zu verwenden:



- Herpes Simplex Virus Thymidinkinase
- Varizella Zoster Virus Thymidinkinase
- bakterielle Nitroreduktase
- bakterielle  $\beta$ -Glucuronidase
- pflanzliche  $\beta$ -Glucuronidase aus Secale cereale
- humane  $\beta$ -Glucuronidase
- humane Carboxy peptidase (CB) zum Beispiel CB-A der Mastzelle, CB-B des Pankreas oder bakterielle Carboxypeptidase
- bakterielle  $\beta$ -Laktamase
- bakterielle Cytosine Deaminase
- humane Catalase bzw. Peroxidase
- Phosphatase, im besonderen humane alkalische Phosphatase, humane saure Prostataphosphatase oder Typ 5 saure Phosphatase
- Oxidase, im besonderen humane Lysyloxidase oder humane saure D-aminooxidase
- Peroxidase, im besonderen humane Glutathion Peroxidase, humane Eosinophilen Peroxidase oder humane Schilddrüsen Peroxidase
- Galaktosidase

b) Therapie von Autoimmunerkrankungen und Entzündungen

b.1) Zielzellen:

- proliferierende Endothelzellen oder
- Makrophagen und/oder Lymphozyten oder
- Synovialzellen

b.2) Effektoren zur Therapie von Allergien, zum Beispiel

- IFN $\beta$
- IFN $\gamma$
- IL-10
- Antikörper bzw. Antikörperfragmente gegen IL-4
- lösliche IL-4-Rezeptoren

- IL-12
  - TGF $\beta$
- b.3) Effektoren zur Verhinderung der Abstoßung von transplantierten Organen, zum Beispiel

- IL-10
- TGF $\beta$
- lösliche IL-1-Rezeptoren
- lösliche IL-2-Rezeptoren
- IL-1-Rezeptorantagonisten
- lösliche IL-6-Rezeptoren
- immunsuppressive Antikörper oder deren V<sub>H</sub> und V<sub>L</sub> enthaltende Fragmente oder deren über einen Linker verbundene V<sub>H</sub>- und V<sub>L</sub>-Fragmente.

Immunsuppressive Antikörper sind beispielsweise Antikörper spezifisch für den T-Zell-Rezeptor oder seinen CD3-Komplex, gegen CD4 oder CD8 des weiteren gegen den IL-2-Rezeptor, IL-1-Rezeptor oder IL-4-Rezeptor oder gegen die Adhäsionsmoleküle CD2, LFA-1, CD28 oder CD40

- b.4) Effektoren für die Therapie von Antikörper-mediierten Autoimmunerkrankungen, zum Beispiel

- TGF $\beta$
- IFN $\alpha$
- IFN $\beta$
- IFN $\gamma$
- IL-12
- lösliche IL-4-Rezeptoren
- lösliche IL-6-Rezeptoren
- immunsuppressive Antikörper oder deren V<sub>H</sub> und V<sub>L</sub>-enthaltende Fragmente

- b.5) Effektoren für die Therapie von zellmedierten Autoimmunerkrankungen, zum Beispiel

- IL-6
  - IL-9
  - IL-10
  - IL-13
  - $\text{TNF}\alpha$  oder  $\text{TNF}\beta$
  - IL-13
  - einen immunsuppressiven Antikörper oder dessen  $V_H$ - und  $V_L$ -enthaltende Fragmente
- b.6) Effektoren: Inhibitoren der Zellproliferation, zytostatische oder zytotoxische Proteine und Enzyme für die Aktivierung von Vorstufen von Zytostatika  
Beispiele für derartige Proteine sind bereits im Abschnitt a.7) aufgeführt.
- b.7) Effektoren für die Therapie der Arthritis

Im Sinne der Erfindung werden Effektoren ausgewählt, die die Entzündung beispielsweise im Gelenk direkt oder indirekt hemmen und/oder die Rekonstitution von extrazellulärer Matrix (Knorpel, Bindegewebe) im Gelenk fördern.

Hierzu gehören zum Beispiel

- IL-1-Rezeptorantagonist (IL-1-RA);  
IL-1-RA inhibiert die Bindung von  $\text{IL-1}\alpha, \beta$
- löslicher IL-1-Rezeptor;  
löslicher IL-1-Rezeptor bindet und inaktiviert IL-1
- IL-6  
IL-6 erhöht die Sekretion von TIMP und Superoxiden und vermindert die Sekretion von IL-1 und  $\text{TNF}\alpha$  durch Synovialzellen und Chondrozyten
- löslicher TNF-Rezeptor  
löslicher TNF-Rezeptor bindet und inaktiviert TNF.
- IL-4  
IL-4 inhibiert die Bildung und Sekretion von IL-1,  $\text{TNF}\alpha$  und MMP

- IL-10

IL-10 inhibiert die Bildung und Sekretion von IL-1,  $\text{TNF}\alpha$  und MMP und erhöht die Sekretion von TIMP

- Insulin-like growth factor (IGF-1)

IGF-1 stimuliert die Synthese von extrazellulärer Matrix.

- $\text{TGF}\beta$ , im speziellen  $\text{TGF}\beta 1$  und  $\text{TGF}\beta 2$

$\text{TGF}\beta$  stimuliert die Synthese von extrazellulärer Matrix.

- Superoxiddismutase

- TIMP, im speziellen TIMP-1, TIMP-2 oder TIMP-3

c) Therapie der mangelhaften Bildung von Zellen des Blutes

c.1) Zielzellen:

- proliferierende, unreife Zellen des blutbildenden Systems oder
- Stromazellen benachbart den blutbildenden Zellen

c.2) Effektoren für die Therapie der Anämie, zum Beispiel

- Erythropoietin

c.3) Effektoren für die Therapie der Leukopenie, zum Beispiel

- G-CSF
- GM-CSF
- M-CSF

c.4) Effektoren für die Therapie der Thrombozytopenie, zum Beispiel

- IL-3
- Leukemia Inhibitory Factor (LIF)
- IL-11
- Thrombopoietin

d) Therapie von Schäden des Nervensystems

d.1) Zielzellen:

- Gliazellen oder

- proliferierende Endothelzellen
- d.2) Effektoren: neuronale Wachstumsfaktoren, zum Beispiel
- FGF
  - Nerve growth factor (NGF)  
Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)
  - Neurotrophin-3 (NT-3)
  - Neurotrophin-4 (NT-4)
  - Ciliary neurotrophic factor (CNTF)
- d.3) Effektoren: Enzyme, zum Beispiel
- Tyrosinhydroxylase
  - Dopadecarboxylase
- d.4) Effektoren: Cytokine und deren Inhibitoren, welche die neurotoxische Wirkung von  $\text{TNF}\alpha$  inhibieren oder neutralisieren, zum Beispiel
- $\text{TGF}\beta$
  - lösliche TNF-Rezeptoren  
TNF-Rezeptoren neutralisieren  $\text{TNF}\alpha$
  - IL-10  
IL-10 inhibiert die Bildung von  $\text{IFN}\gamma$ ,  $\text{TNF}\alpha$ , IL-2 und IL-4
  - lösliche IL-1-Rezeptoren
  - IL-1-Rezeptor I
  - IL-1-Rezeptor II  
lösliche IL-1-Rezeptoren neutralisieren die Aktivität von IL-1
  - IL-1-Rezeptor-Antagonist
  - lösliche IL-6-Rezeptoren
- e) Therapie von Störungen des Blutgerinnungs- und Blutkreislaufsystems
- e.1) Zielzellen:
- Endothelzellen oder

- proliferierende Endothelzellen oder
- somatische Zellen in Nachbarschaft von Endothelzellen und glatte Muskelzellen oder
- Makrophagen

e.2) Zielstrukturen: Proteine des Blutgerinnungssystems wie beispielsweise

- Thrombin
- Fibrin

e.3) Effektoren für die Inhibition der Gerinnung oder für die Förderung der Fibrinolyse, zum Beispiel

- Tissue Plasminogen Activator (tPA)
- Urokinase-type Plasminogen Activator (uPA)
- Hybride von tPA und uPA
- Protein C
- Hirudin
- Serin Proteinase Inhibitoren (Serpine), wie beispielsweise C-1S-Inhibitor,  $\alpha$ 1-Antitrypsin oder Antithrombin III
- Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI)

e.4) Effektoren für die Förderung der Gerinnung, zum Beispiel

- F VIII
- F IX
- von Willebrand factor
- F XIII
- PAI-1
- PAI-2
- Tissue Factor and Fragmente hiervon

e.5) Effektoren: Angiogenesefaktoren, zum Beispiel

- VEGF

- FGF
- Tie-1
- Tie-2

e.6) Effektoren für die Blutdrucksenkung, zum Beispiel

- Kallikrein
- Endothelzell "nitric oxide synthase"

e.7) Effektoren für die Inhibition der Proliferation von glatten Muskelzellen nach Verletzungen der Endothelschicht, zum Beispiel

- ein antiproliferatives, zytostatisches oder zytotoxisches Protein oder
- ein Enzym zur Aufspaltung von Vorstufen von Zytostatika in Zytostatika wie bereits oben (Abschnitt a.7) aufgeführt

e.8) Effektoren: weitere Blutplasmae, zum Beispiel

- C1-Inaktivator
- Serum Cholinesterase
- Transferrin
- 1-Antritypsin

f) Impfungen

f.1) Zielzellen:

- Muskelzellen oder
- Makrophagen und/oder Lymphozyten

f.2) Effektoren für die Prophylaxe von Infektionserkrankungen

Die Möglichkeiten, auf konventionellem Wege wirkungsvolle Impfstoffe herzustellen, sind beschränkt.

Als Effektor ist ein vom Infektionserreger gebildetes Protein, Glykoprotein oder Lipoprotein, auszuwählen, welches durch Auslösung einer

Immunreaktion, d.h. durch Antikörperbindung und/oder durch zytotoxische T-Lymphozyten zur Neutralisierung und/oder zur Abtötung des Erregers führt. Derartige sogenannte Neutralisationsantigene werden als Impfantigene bereits angewandt (siehe Übersicht bei Ellis, Adv. Exp. Med. Biol. 327, 263 (1992)).

Bevorzugt im Sinne der Erfindung werden Neutralisationsantigene folgender Erreger eingesetzt:

- Influenza A-Virus
- HIV
- Tollwut-Virus
- HSV (Herpes Simplex Virus)
- RSV (Respiratory Syncytial Virus)
- Parainfluenza-Virus
- Rotavirus
- VZV (Varizella Zoster Virus)
- CMV (Cytomegalo-Virus)
- Masern-Virus
- HPV (Humanes Papillomvirus)
- HBV (Hepatitis B-Virus)
- HCV (Hepatitis C-Virus)
- HDV (Hepatitis D-Virus)
- HEV (Hepatitis E-Virus)
- HAV (Hepatitis A-Virus)
- Vibrio Cholera-Antigen
- Borrelia Burgdorferi
- Helicobacter pylori
- Malaria-Antigen
- Zu Effektoren im Sinne der Erfindung gehört jedoch auch ein Antiidiotyp-Antikörper oder seine Antigen-bindenden Fragmente, dessen Antigenbindungsstrukturen (die "complementarity determining regions")



Kopien der Protein- oder Kohlenhydratstruktur des Neutralisationsantigens des Infektionserregers darstellen.

Derartige Antiidiotyp-Antikörper können besonders Kohlenhydratantigene bei bakteriellen Infektionserregern ersetzen.

Derartige antiidiotypische Antikörper und ihre Spaltprodukte wurden von Hawkins et al. (J. Immunother. 14, 273 (1993)) und Westerink und Apicella (Springer Seminars in Immunopathol. 15, 227 (1993)) übersichtlich beschrieben.

f.3) Effektoren: Tumorantigene

- Hierzu gehören Antigene auf Tumorzellen. Derartige Antigene wurden zum Beispiel von Sedlacek et al. (Contrib. to Oncol. 32, Karger Verlag, München (1988) und Contrib. to Oncol 43, Karger Verlag, München (1992)) übersichtlich dargestellt.

Weitere Beispiele stellen folgende Antigene bzw. für Antiidiotypantikörper korrespondierend mit folgenden Antigenen dar:

- Sialyl Lewis
- Peptide auf Tumoren, welche von T-Zellen erkannt werden
- von Onkogenen exprimierte Proteine
- Blutgruppenantigene und deren Vorläufer
- Antigene auf dem polymorphen epithelialen Mucin
- Antigene auf Heat Shock Proteinen

g) die Therapie von chronischen Infektionserkrankungen

g.1) Zielzelle:

- Leberzelle
- Lymphozyt und/oder Makrophage
- Epithelzelle

- Endothelzelle

g.2) Effektoren beispielsweise

- ein Protein, welches zytostatische, apoptotische oder zytotoxische Wirkungen aufweist.
- ein Enzym, welches eine Vorstufe einer antiviralen oder zytotoxischen Substanz in die aktive Substanz spaltet.

g.3) Effektoren: antivirale Proteine

- antiviral wirksame Cytokine und Wachstumsfaktoren. Hierzu zählen beispielsweise  $\text{IFN}\alpha$ ,  $\text{IFN}\beta$ ,  $\text{IFN}\gamma$ ,  $\text{TNF}\beta$ ,  $\text{TNF}\alpha$ , IL-1 oder  $\text{TGF}\beta$
- Antikörper einer Spezifität, die das jeweilige Virus inaktiviert oder dessen  $V_H$  und  $V_L$  enthaltende Fragmente oder dessen über einen Linker verbundene  $V_H$  und  $V_L$  Fragmente herstellt wie bereits beschrieben.

Antikörper gegen Virusantigen sind beispielsweise:

anti HBV

anti HCV

anti HSV

anti HPV

anti HIV

anti EBV

anti HTLV

Anti Coxsackie Virus

anti Hantaan Virus

- ein Rev bindendes Protein. Diese Proteine binden an die Rev-RNA und inhibieren Rev-abhängige posttranskriptionelle Stufen der Retrovirus-Genexpression. Beispiele für Rev-bindende Proteine sind:

RBP9-27

RBP1-8U

RBP1-8D

Pseudogene von RBP1-8

g.4) Effektoren: antibakterielle Proteine

Zu den antibakteriellen Proteinen gehören beispielsweise Antikörper, die bakterielle Toxine neutralisieren oder Bakterien opsonieren. Beispielsweise gehören hierzu Antikörper gegen

Meningokokken C oder B

E. coli

Borrelia

Pseudomonas

Helicobacter pylori

Staphylococcus aureus

h) Kombination gleicher oder unterschiedlicher Effektoren

Bevorzugt im Sinne der Erfindung sind zwei unterschiedliche Komponenten d), welche zumindest eine additive Wirkung aufweisen, über die Komponenten b) und c) miteinander zu komplexieren.

Im Sinne der Erfindung bevorzugt sind Kombinationen von Effektoren beispielsweise für

h.1) die Therapie von Tumoren

- gleiche oder unterschiedliche, zytostatische, apoptotische, zytotoxische und/oder entzündungserregende Proteine oder
- gleiche oder unterschiedliche Enzyme für die Spaltung der Vorstufe eines Zytostatikums

## h.2) die Therapie von Autoimmunerkrankungen

- unterschiedliche Cytokine oder Rezeptoren mit synergistischer Wirkung zur Hemmung der zellulären und/oder humoralen Immunreaktion oder
- unterschiedliche oder gleiche TIMPs

## h.3) die Therapie von mangelhafter Bildung von Zellen des Blutes

- unterschiedliche, hierarchisch aufeinanderfolgende Cytokine, wie beispielsweise IL-1, IL-3, IL-6 oder GM-CSF und Erythropoietin, G-CSF oder Thrombopoietin

## h.4) die Therapie von Nervenzellschäden

- ein neuronaler Wachstumsfaktor und ein Cytokin oder der Inhibitor eines Cytokins

## h.5) die Therapie von Störungen des Blutgerinnungs- und Blutkreislaufsystems

- ein Antithrombotikum und ein Fibrinolytikum (z.B. tPA oder uPA) oder
- ein zytostatisches, apoptotisches oder zytotoxisches Protein und ein Antithrombotikum oder ein Fibrinolytikum
- mehrere unterschiedliche, synergistisch wirkende Blutgerinnungsfaktoren, beispielsweise F VIII und vWF oder F VIII und F IX

## h.6) Impfungen

- ein Antigen und ein immunstimulierendes Cytokin, wie beispielsweise IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, GM-CSF, IL-3 oder IL-4 Rezeptor
- unterschiedliche Antigene eines Infektionserregers oder unterschiedlicher Infektionserreger oder
- unterschiedliche Antigene eines Tumortyps oder unterschiedlicher Tumortypen

## h.7) Therapie von viralen Infektionserkrankungen

- ein antivirales Protein und ein zytostatisches, apoptotisches oder zytotoxisches Protein
- Antikörper gegen unterschiedliche Oberflächenantigene eines Virus oder mehrere Viren

#### h.8) Therapie von bakteriellen Infektionserkrankungen

- Antikörper gegen unterschiedliche Oberflächenantigene und/oder Toxine eines Keimes

#### 4. Multifunktioneller Ligand für virale und nichtvirale Vektoren zur Gentherapie

Multifunktionelle Liganden wurden bereits in der Patentanmeldung EP-A 0 846 772 ausführlich beschrieben. Auf diese Patentanmeldung wird ausdrücklich Bezug genommen.

Bei Verwendung als multifunktioneller Ligand ist eine Komponente a) auszuwählen, welche gegen eine zelluläre Zielstruktur gerichtet ist. Beispiele für Liganden (Komponente a) spezifisch für zelluläre Zielstrukturen sind im Abschnitt 3) bereits aufgeführt worden.

In einem multifunktionellen Liganden ist der Effektor (Komponente d) so auszuwählen, daß er an einen viralen Vektor oder an einen nichtviralen Vektor bindet. Derartige Effektoren sind beispielsweise:

- ein zellulärer Rezeptor für ein Virus, wie beispielsweise für AdV, AAV, ein Lentivirus, ein RTV, Vacciniavirus, HSV, Influenzavirus, HJV
- ein rekombinanter Antikörper spezifisch für ein Virusprotein, für einen nichtviralen Vektor oder für eine Nukleinsäure, wie beispielsweise ein IgG, F(ab)<sub>2</sub>, Fab, rec. Fv, Diabody oder einzelkettiges, doppelantigenbindendes Protein
- ein Peptid mit einer reaktiven Gruppe zur Konjugation an ein Virusprotein
- ein Peptid mit Bindeaffinität zu einer definierten Nukleinsäuresequenz

Bevorzugterweise stellt die Komponente d) ein ganzes Antikörpermolekül oder ein Epitop-bindendes Fragment eines humanen Antikörpers dar.

Die murinen monoklonalen Antikörper sind bevorzugt in humanisierter Form einzusetzen. Die Humanisierung erfolgt in der von Winter et al. (Nature 349, 293 (1991)) und Hoogenboom et al. (Rev. Tr. Transfus. Hemobiol. 36, 19 (1993)) dargestellten Weise. Antikörperfragmente und rekombinante Fv-Fragmente werden entsprechend dem Stand der Technik, und wie bereits beschrieben, hergestellt.

Ob ein bivalentes oder ein monovalentes Fragment Verwendung findet, ist von der Wahl der Antikörperspezifität und des Genkonstruktes abhängig. Wenn der gewählte Antikörper die Fusionsaktivität des Hüllproteins eines viralen Genkonstruktes beeinträchtigt (wie z.B. von Ubol et al. (J. Virol. 69 1990 (1995)) beschrieben), so ist ein monovalentes Antikörperfragment zu bevorzugen.

Die Spezifität des Antikörpers richtet sich nach der Art des verwendeten Genkonstruktes.

- Ist das Genkonstrukt ein nackte RNA oder eine nackte DNA alleine oder im Komplex mit einem nichtviralen Träger, so ist eine der erfindungsgemäßen Ausführungsformen dieser Erfindung, daß die Spezifität des Antikörpers gerichtet ist gegen solche Epitope, welche in die DNA eingeführt wurden.

Derartige Epitope können erzeugt werden durch Bindung von xenogenen Substanzen an die DNA. Beispiele hierfür sind

- \* Kreuzvernetzungen der DNA durch Cisplatin
- \* Alkylierung am N<sup>7</sup> von Guanin durch Alkylantien wie Nitrogen-Mustard, Melphalan, Chlorambucil
- \* Interkalation in die Doppelhelix der DNA von Anthracyclinen wie Doxorubicin, Daunomycin

Monoklonale Antikörper gegen derartige neu eingeführte Epitope auf der DNA sind beispielsweise:

- Antikörper gegen methylierte DNA
- Antikörper gegen O<sup>6</sup>-ethyl deoxyguanosin (nach Behandlung der DNA mit Ethylnitrosoharnstoff)
- Antikörper gegen N<sup>7</sup>-ethylguanin
- Antikörper gegen N<sup>5</sup>-methyl-N<sup>5</sup>-formyl-2,5,6-triamino-4-hydroxy pyrimidine
- Antikörper gegen O<sup>6</sup>-methyl-2'-deoxyguanosin
  - O<sup>6</sup>-ethyl-2'-deoxyguanosin
  - O<sup>6</sup>-n-butyl-2'-deoxyguanosin
  - O<sup>6</sup>-isopropyl-2'-deoxyguanosin
  - O<sup>4</sup>-methyl-2'-deoxythymidin
  - O<sup>4</sup>-ethyl-2'-deoxythymidin
- Antikörper gegen Melphalan Addukte mit DNA
- Antikörper gegen Anthracycline

Neue Epitope in die DNA entstehen jedoch auch durch Methylierung der DNA im Rahmen des DNA-Stoffwechsels.

Von einer Reihe von E. coli Stämmen ist bekannt, daß sie die DNA der in sie eingeführten Plasmide am N<sup>6</sup> des Adenins methylieren (Winnacker, From Genes to Clones, page 18/19, VCH Publisher, Weinheim (1987)). Bakterien besitzen das Enzym DNA-Adenin-Methylase, das während der Replikation spezifisch Adenine an der N<sup>6</sup>-Position methyliert (Hattman et al., J. Mol. Biol. 126, 367 (1978)).

Ein besonderer Gegenstand dieser Erfindung ist somit die Verwendung vom monoklonalen Antikörpern gegen methylierte DNA - im besonderen gegen methyliertes N<sup>6</sup> des Adenins - im erfindungsgemäßen Ligandensystem.

- Ist das Genkonstrukt in Komplex mit einem nichtviralen Träger, so ist eine weitere besondere Ausführungsform dieser Erfindung, daß die Spezifität des Antikörpers gerichtet ist gegen ein Epitop auf dem Träger.

Zu diesen Trägern gehören kationische Polymere, Peptide, Proteine, Polyamine oder kationische Lipide wie beispielsweise kationische Lipide und Phospholipide. Beispiele für Antikörper gegen derartige Träger sind

- \* Antikörper gegen Spermidin, Spermin oder Putrescin
  - \* Antikörper gegen Polylysin
  - \* Antikörper gegen Albumin
  - \* Antikörper gegen Phospholipid
  - \* Antikörper gegen Polyethylenimin
- Ist das Genkonstrukt ein Virus, so ist die Spezifität des Antikörpers gerichtet gegen ein oder mehrere gleiche oder unterschiedliche Epitope auf den Hüllproteinen des Virus. Da der Linker im verwendeten Ligandensystem bevorzugterweise ein fusiogenes Peptid oder Protein darstellt, können auch Antikörper verwendet werden, welche durch Bindung an das Hüllprotein die Zelladhäsion und/oder die fusiogene Aktivität des Virus beeinträchtigen.

Antikörper gegen Hüllproteine von Viren, die als Vektoren Verwendung finden können, sind beispielsweise Antikörper gegen das

- \* murine Leukämie Virus
- \* HIV-Virus
- \* Adenovirus
- \* Herpes Simplex Virus
- \* Cytomegalovirus
- \* Minute Virus of mice
- \* adenoassoziiertes Virus
- \* Sindbis-Virus



\* Vaccinia Virus

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung stellt die Komponente d) den zellexternen Teil eines Fc-Rezeptors dar. An diesen Fc-Rezeptor bindet über sein Fc-Teil einer der bereits erwähnten Antikörper, welcher mit seinem antigenbindenden Teil direkt oder indirekt an das Genkonstrukt bindet.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform stellt die Komponente d) eine kationische Struktureinheit, wie beispielsweise eine kationische Aminosäure, ein kationisches Peptid oder Protein oder ein biogenes Amin dar, welche mit dem Genkonstrukt komplexieren können.

Zu diesen kationischen Struktureinheiten gehören beispielsweise:

- Lysin oder Polylysin
- Arginin oder Polyarginin
- Histidin oder Polyhistidin
- Peptide enthaltend mindestens 1 Lysin, 1 Arginin und/oder 1 Histidin
- Polyamine wie beispielsweise Cadaverin, Spermidin, Spermin, Agmatin oder Putrescin

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform stellt die Komponente d) den Rezeptor für das Hüllprotein des das Transgen beherbergenden Virus dar.

Derartige Rezeptoren sind beispielsweise für folgende Viren beschrieben worden:

- HIV
  - \* das CD4-Molekül (löslich oder nativ)
  - \* Galactosylceramid
  - \* Rezeptoren für Chemokine
- HBV
  - \* der IL-6 Rezeptor

- \* Annexin oder Apolipoprotein
- HTLV
  - \* der IL-2 Rezeptor (die  $\beta$ - wie auch die  $\gamma$ -Kette)
- Masern Virus
  - \* das CD46 Molekül
- Friend Leukemia Virus
  - \* der Erythropoietin Rezeptor
- Varizella Zoster
  - \* das Fc-Fragment von humanem Immunglobulin G
- Sendai Virus
  - \* das Glycophorin
- Influenza C-Virus
  - \* die N-acetyl-9-acetamido-9-deoxy-neuraminsäure
  - \* die 9- $\beta$ -acetyl-N-acetyl-neuraminsäure
- Foot and Mouth Disease Virus
  - \* das integrin  $\alpha V\beta 3$
- EBV
  - \* der Complement Rezeptor 2 (CD21)
- Herpes simplex Virus
  - \* der 275-kDa Mannose-6-Phosphat-Rezeptor oder der 46-kDa Mannose-6-Phosphat-Rezeptor
- adenovirales Virus
  - \* der CAR (Cocksackie-Adenovirus-Rezeptor)

## 5. Einfügung eines fusiogenen Peptids oder eines Translokalisationspeptids

Bei multivalenten Proteinkomplexen, bei denen der Effektor (Komponente d) intrazellulär einzudringen hat, um prophylaktisch oder therapeutisch zu wirken oder die als multifunktionelle Liganden einen Vektor in das Zytoplasma einer Zelle einführen sollen, ist dem Effektor ein fusiogenes Peptid anzufügen. Dieses fusiogene

Peptid kann zwischen der Komponente c) und d) eingefügt oder der Komponente d) angefügt werden. Zu den fusiogenen Peptiden gehören beispielsweise:

- Peptide enthaltend die Translokationsdomäne (Domäne II) des Exotoxins A von *Pseudomonas*
- Peptide enthaltend das Peptid  
GLFEALLELLESLWELLLEA (SEQ ID NO.: 1)
- Peptide enthaltend das Peptid  
AALAEA[LAEA]<sub>4</sub>LAAAAGC (SEQ ID NO.: 2)
- Peptide enthaltend das Peptid  
FAGV-VLAGAALGVAAAAQI (SEQ ID NO.: 3)  
des Fusionsproteins des Masern-Virus
- Peptide enthaltend das Peptid  
GLFGAIAGFIEGGWWGMIDG (SEQ ID NO.: 4)  
des HA2 Proteins von Influenza A
- Peptide enthalten das Peptid  
GLFGAIAGFIENGWEGMIDGGLFGAIAGFIENGWEGMIDG (SEQ ID NO.: 5)  
oder das Peptid

GLFGAIAGFIE; (SEQ ID NO.: 6)

ALFGAIAGFIE; (SEQ ID NO.: 7)

LFLGAIAGFIE; (SEQ ID NO.: 8)

LLLGAIAGFIE; (SEQ ID NO.: 9)

LILLGAIAGFIE; (SEQ ID NO.: 10)

GIFGAIAGFIE; (SEQ ID NO.: 11)

GLLLGAIAGFIE; (SEQ ID NO.: 12)

GLFAAIAGFIE; (SEQ ID NO.: 13)

GLFEAIAGFIE; (SEQ ID NO.: 14)

GLFGAMAGFI; (SEQ ID NO.: 15)

GLFGAIAGLIE; (SEQ ID NO.: 16)

GLFGAIAGFIV; (SEQ ID NO.: 17)

GLFEAIAEFIEGGWEGLIEG (SEQ ID NO.: 18) oder  
GLLEALAELEGGWEGLLEG (SEQ ID NO.: 19).

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung werden desweiteren Proteine von Viren verwendet, welche fusiogene Eigenschaften haben. Eine Reihe von Viren besitzt fusiogene und/oder translozierende Hüllproteine, so beispielsweise Paramyxoviren, Retroviren und Herpesviren. Hierzu gehören beispielsweise das TAT-Protein von HIV oder dessen translokalisierende Aminosäuresequenz oder das VP22-Protein von HSV.

Eine Reihe von Viren besitzen des weiteren Glykoproteine, die verantwortlich sind sowohl für die Virusanheftung als auch nachfolgend für die Zellmembranfusion (Gaudin et al., J. Gen. Viro. 76, 1541 (1995)).

Derartige Proteine werden beispielsweise von Alpha-, Rhabdo- und Orthomyxoviren gebildet.

Virale fusiogene Proteine im Sinne der Erfindung wurden übersichtlich beschrieben von Hughson (Curr. Biol. 5, 265 (1995)), Hoekstra (J. Bioenergetics Biomembranes 22, 675 (1990)), und White (Ann. Rev. Physiol. 52, 675 (1990)).

Fusiogene Proteine im Sinne dieser Erfindung sind beispielsweise:

- das Haemagglutinin von Influenza A- oder B-Viren, insbesondere die HA2-Komponente
- das M2-Protein von Influenza A-Viren  
alleine oder in Kombination mit dem Haemagglutinin des Influenza-Virus eingesetzt oder mit Mutanten von Neuraminidase von Influenza A, denen die Enzymaktivität fehlt, die jedoch Haemagglutination bewirken.
- Peptidanaloga des Influenza-Virus Haemagglutinins

Page 51

missing upon filing

## 6. Einfügung von Proteasespaltsequenzen

Gegenstand der Erfindung sind des weiteren multifunktionelle Proteinkomplexe, welche zwischen der Komponente a) und b) oder zwischen der Komponente c) und d) eine Peptidsequenz besitzen, welche für Proteasen spaltbar ist. Durch diese Proteasen kann der Effektor von dem Liganden (Komponente a) oder von dem Liganden und den mutierten Proteinen [Komponenten a), b) und c)] abgespalten werden und beispielsweise am Ort der Anreicherung der multivalenten Proteinkomplexe in freier Form seine Wirkung entfalten.

Gegenstand der Erfindung sind insbesondere Spaltsequenzen, welche durch Proteasen, die in Tumoren oder von Tumorzellen oder von Entzündungszellen gebildet werden, gespalten werden.

Beispiele von Spaltsequenzen für die Enzyme

- Plasminogenaktivator
- prostataspezifisches Antigen
- Cathepsin
- Stromelysin
- Collagenase und
- Plasminogen

sind in der Patentanmeldung EP-A 0 859 058 aufgeführt, auf welche ausdrücklich Bezug genommen wird.

Gegenstand der Erfindung sind des weiteren multivalente Proteinkomplexe mit Spaltsequenzen, welche von Proteasen, die von Viren gebildet werden, gespalten werden.

Beispiele von Spaltsequenzen für Enzyme von Retroviren, Polioviren, Influenzaviren, Epstein-Barr Viren, Herpes Simplex Viren, Hepatitisviren, Pockenviren, Cytomegalieviren und Dengue Viren sind in der deutschen Patentanmeldung DE 198

50987.1 (nicht veröffentlicht) aufgeführt, auf welche ausdrücklich Bezug genommen wird.

Gegenstand der Erfindung sind des weiteren multivalente Proteinkomplexe mit Spaltsequenzen, welche von Proteasen, die in der Zelle freigesetzt werden können, gespalten werden.

Beispiele von derartigen Proteasen sind beispielsweise Caspasen, wie Caspasen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 und 9.

Die zugehörigen Spaltsequenzen sind in der Patentanmeldung DE 198 50987.1 (nicht veröffentlicht) aufgeführt, auf welche ausdrücklich Bezug genommen wird.

#### 7. Künstliche Transkriptionsfaktoren für die Kontrolle der Expression von Genen

In der Patentanmeldung EP-A 0 805 209 sind aktivatorresponsive Promotoren beschrieben worden. Auf diese Erfindung wird in dieser Erfindung ausdrücklich Bezug genommen. Diese aktivatorresponsiven Promotoren werden durch einen künstlichen Transkriptionsfaktor aktiviert, welcher im Prinzip aus zwei Aktivatorsubeinheiten besteht: die Subeinheit A und die Subeinheit B. Beide Subeinheiten enthalten Bindeproteine (A, B). In der EP-A 0 805 209 wurden Bindeproteine (A, B) ausgewählt, welche natürlicherweise den Komplex AB bilden, so daß die Subeinheit A sich mit der Subeinheit B zu einem funktionsfähigen Transkriptionsfaktorkomplex verbindet. Gegenstand der Erfindung sind nunmehr künstliche Transkriptionsfaktoren für aktivatorresponsive Promotoren, bei denen die Bindeproteine A+B mutierte Bindeproteine darstellen.

In der einfachsten Form besteht dieser künstliche Transkriptionsfaktorkomplex aus folgenden Komponenten:

Komponente a)	mindestens einem Liganden für einen Reaktionspartner = Aktivierungsdomäne
---------------	--

Komponente b)	ein Bindeprotein derartig mutiert, daß es sich ausschließlich mit der Komponente c) verbindet
Komponente c)	ein Bindeprotein derartig mutiert, daß es sich ausschließlich mit der Komponente b) verbindet
Komponente d)	mindestens einen Effektor = eine DNA-Bindedomäne

Gegenstand der Erfindung sind des weiteren Nukleinsäurekonstrukte, welche für einen Transkriptionsfaktorkomplex entsprechend dieser Erfindung kodieren. Die Expression dieses Nukleinsäurekonstruktes steht hierbei unter der Kontrolle von Promotoren wie in der Patentanmeldung EP-A 0 805 209 aufgeführt, auf welche ausdrücklich Bezug genommen wird.

#### 8. Neue analytische und diagnostische Systeme

Gegenstand der Erfindung sind neue komplexbildende Proteine für analytische oder diagnostische Systeme zur qualitativen oder quantitativen Analyse oder Diagnose eines Reaktionspartners.

In solchen diagnostischen Systemen stelle die Komponente a) mindestens einen Liganden dar, welche eine spezifische Bindung mit dem zu analysierenden Reaktionspartner eingeht. Dieser Ligand ist direkt oder indirekt verbunden mit mindestens einem mutierten Bindeprotein [Komponenten b)<sub>1-b)n</sub>], so daß sich die Komponente ab ergibt. Des weiteren ist mindestens ein mutiertes Bindeprotein [Komponente c)<sub>1-c)n</sub>], welches mit der Komponente b) über mindestens zwei Bindestellen dimerisieren kann, verbunden mit mindestens einem Effektor (Komponente c), wobei dieser Effektor eine signalgebende Substanz (Analyten) darstellt. Aus der Verbindung der Komponente b) mit der Komponente c) ergibt sich die Komponente cd.

Die Komponente ab bindet über a) an den Reaktionspartner. Durch Komplexbildung der Komponente ab mit der Komponente bc läßt sich die Menge des



Reaktionspartners, an welchen die Komponente ab über Komponente a) gebunden ist, ermitteln.

Dieses diagnostische System kann beispielsweise in den zwei aufgeführten Ausführungsformen (siehe Figur 1 und 2) verwendet werden:

In der ersten Ausführungsform (siehe Figur 1) stellt die Komponente b) ein Homo- (oder Hetero-)multimer dar  $[ \text{Komponente b})_1\text{-b})_n ]$ , an welche viele gleiche (oder unterschiedliche) Komponenten c) jeweils als Monomer und jeweils verbunden mit der Komponente d) binden.

Mit dieser Ausführungsform werden viele signalgebende Komponenten [Analyten, Komponente d)] an den zu analysierenden Reaktionspartner gebunden, was die Empfindlichkeit des Systems steigert.

In der zweiten Ausführungsform (siehe Figur 2) stellen sowohl die Komponente b) als auch die Komponente c) Multimere dar, wobei an die Komponente c) nur eine oder wenige Komponenten d) gebunden sind. Mit dieser Ausführungsform werden zwar nur wenige Komponenten d) an den zu analysierenden Reaktionspartner gebunden, aber die Bindung zwischen den Komponenten c) und d) ist außerordentlich stark, was die Spezifität des Nachweises von dem zu analysierenden Reaktionspartners erhöhen kann.

In einer weiteren besonderen Ausführungsform der Erfindung ist die Komponente c)  $[c_1\text{-}c_n]$  mit mindestens einer weiteren Komponente b  $[b_1\text{-}b_n]$  gebunden, an welche mindestens eine weitere Komponente cd dimerisieren kann. Ein Beispiel hierfür ist in Figur 1b dargestellt.

Diese besondere Ausführungsform steigert die Empfindlichkeit des Testsystems beträchtlich.

Mit Hilfe dieses erfindungsgemäßen analytischen oder diagnostischen Systems kann ein Reaktionspartner in oder auf einer festen Phase, in einer Flüssigkeit, beispielsweise in einer Körperflüssigkeit, auf Zellen und in Geweben bestimmt werden.

Gemäß der Erfindung kann die Komponente a) darstellen:

- eine Nukleotidsequenz. Bei Wahl einer Nukleotidsequenz ist diese endständig so zu derivatisieren [beispielsweise entsprechend WO95/02422 oder durch Einfügung einer Bindesequenz für ein Nukleotidbindeprotein (wie beispielsweise für LexA, Gal4 oder für einen Transkriptionsfaktor) oder für einen Antikörper, daß an sie direkt oder indirekt über ein Nukleotidbindeprotein oder über einen antigenbindenden Teil eines Antikörpers die Komponente b) gekoppelt werden kann.
- einen Liganden für einen zellulären Rezeptor
- ein Virushüllprotein
- einen zellulären Rezeptor für ein Virushüllprotein
- einen zellulären Rezeptor für einen Wachstumsfaktor, ein Cytokin, ein Chemokin, ein Peptidhormon, einen Mediator oder ein Steroid
- ein Protein, welches sich mit einem Partnerprotein verbindet und hierdurch an einer biologischen Reaktionskette teilhat, beispielsweise ein Komplementfaktor, ein Gerinnungsfaktor, ein Faktor des Kininsystems, des Fibrinolysesystems oder ein plasmatischer oder zellulärer Enzyminhibitor oder ein plasmatisches oder zelluläres Enzym
- den extrazellulären Teil eines Fc-Rezeptors, an welchem ein Antikörper spezifisch für eine Zielzelle über seinen Fc-Teil gebunden wird
- ein Antikörpermolekül oder der epitopbindende Teil eines murinen oder humanen Antikörpermoleküls.

Rekombinante Antikörperfragmente werden hergestellt wie bereits in Abschnitt 3) aufgeführt.

In einem analytischen oder diagnostischen System gemäß der Erfindung kann die signalgebende Komponente, der Analyt (Komponente d) beispielsweise darstellen ein fluoreszierendes Molekül, ein Molekül, welches eine Chemolumineszenzreaktion auslöst, ein Enzym, wie beispielsweise eine Phosphatase oder Peroxydase zur Spaltung eines zu messenden Substrates, ein Isotop oder ein Metall.

Mit Hilfe des erfindungsgemäßen analytischen und diagnostischen Systems wird ein zu bestimmender Reaktionspartner vermischt mit einem Überschuß der Komponente ab. Der nicht an den zu bestimmenden Reaktionspartner gebundene Anteil von Komponente ab wird beispielsweise durch Waschen entfernt. Nachfolgend wird die an den Reaktionspartner gebundene Komponente ab mit einem Überschuß von Komponente cd versetzt, der nicht an die Komponente ab gebundene Anteil der Komponente bc beispielsweise durch Waschen entfernt und die an den Reaktionspartner über die Komponenten ab und c) gebundene Komponente d) bestimmt.

#### Beispiele zur Verdeutlichung des Erfindungsgegenstandes

##### Herstellung und Prüfung einer Aktivator-responsiven Promotereinheit

Es wurde eine Aktivator-responsive Promotereinheit hergestellt, bei welcher sich eine Aktivatorsubeinheit A mit einer Aktivatorsubeinheit B (siehe Figur 3) verbindet. Die Verbindung erfolgt über mutiertes c-jun und mutiertes c-fos (siehe Figur 4). Der Komplex ist ein Transkriptionsfaktor, welcher einen Aktivator-responsiven Promoter aktiviert.

Diese erfindungsgemäße Aktivator-responsive Promotereinheit besteht aus folgenden unterschiedlichen, stromabwärts aufeinanderfolgenden Nukleotidsequenzen:

**Aktivatorsubeinheit A:**

- der Promoter des Cyclin A Gens (Nukleinsäuren -214 bis +100; Zwicker et al., EMBO J. 14, 4514 (1995))
- dem nuklearen Lokalisationssignal (NLS) von SV40 (SV40 Large T, Aminosäuren 126-132; PKKKRKV (SEQ ID NO.: 20), Dingwall et al., TIBS 16, 478 (1991))
- der sauren Transaktivierungsdomäne (TAD) von HSV-1 VP16 (VP16, Aminosäuren 411 bis 455; Triezenberg et al., Genes Dev. 2, 718 (1988))
- der cDNA für den leucine Zipper Teil des c-jun Proteins (Aminosäuren 276 bis 312; Mark et al., Nature 373, 257 (1995)) in dem die Aminosäuren 283, 288 und 302 mutiert sind (m-jun).

Beschreibung der Mutationen (Figur 2):

Aminosäure 283 K → E

Aminosäure 288 K → E

Aminosäure 302 R → E

**Aktivatorsubeinheit B:**

- der Promoter des Tyrosinase Gens (2X die Enhancer Sequenz, Nukleinsäuren -2014 bis -1820 und der Kernpromotor Nukleinsäuren -209 bis +51; Shibata et al., J. Biol. Chem. 267, 20584 (1992))
- dem nuklearen Lokalisationssignal (NLS) von SV40 (SV40 Large T, Aminosäuren 126-132; PKKKRKV (SEQ ID NO.: 20), Dingwall et al., TIBS 16, 478 (1991))
- der cDNA für die DNA-Bindedomäne des Gal4 Proteins (Aminosäuren 1 bis 147, Chasman und Kornberg, Mol. Cell. Biol. 10, 2916 (1990))
- der cDNA für den leucine Zipper Teil des c-fos Proteins (Aminosäuren 160 bis 196; Mark et al., Nature 373, 257 (1995)) in dem die Aminosäuren 167, 172 und 181 mutierten sind (m-fos).

Beschreibung der Mutationen (Figur 2):

Aminosäure 167 E → K

Aminosäure 172 E → K

Aminosäure 181 E → K

#### Dimerisierung von mutiertem c-fos mit mutiertem c-jun

Die Expressionsprodukte der Aktivatorsubeinheiten A und B dimerisieren durch Bindung des mutierten c-fos leucine Zipper an den mutierten c-jun leucine Zipper.

Die Dimerisierung der Aktivatorsubeinheiten A und B, d.h. die Bindung des mutierten c-fos leucine Zipper an den mutierten c-jun leucine Zipper, wurde wie folgt geprüft:

Die Proteine wurden in einem "in vitro translation" System (TNT T7 quick coupled transcription/translation system, Promega, Madison, WI) mit oder ohne ( $S^{35}$ )-Methionin synthetisiert. Nachfolgend wurden die synthetisierten Proteine (m-jun-VP16 und m-fos-GAL4) im Verhältnis 1:1 vermischt und die Komplexe gelelektrophoretisch getrennt und nach Immunpräzipitation mit einem Antikörper anti-GAL4 analysiert.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

- Das Protein m-jun-VP16 kann sich mit dem Protein m-fos-GAL4 verbinden.
- Das Protein m-jun-VP16 kann sich nicht mit dem Protein wt-fos-GAL4 und das Protein wt-jun-VP16 kann sich nicht mit dem Protein m-fosGAL4 verbinden (siehe Tabelle 1).

Das dimere Protein stellt einen chimären Transkriptionsfaktor für den Aktivator-responsiven Promotor 10x (Gal4-SV40) dar.

#### Aktivator-responsiver Promotor und das Effektorsystem

Der Aktivator-responsive Promotor hat folgende Zusammensetzung:

- 10x die Bindesequenz für Gal4-Bindeprotein mit der Nukleotidsequenz 5'-CGGAGTACTGTCCTCCG-3' (Webster et al., Cell 52, 169 (1988); SEQ ID NO.:21)
- der basale Promotor von SV40 (Nukleinsäuren 48 bis 5191; Tooze (Ed). DNA Tumor Viruses (Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory))
- die cDNA für das Reportergen Luciferase (Luc) (Nordeen, BioTechniques 6, 454 (1988))

Die Reihenfolge der Nukleotidsequenzen und deren Aktivierungseinheiten ist in Figur 5 dargestellt.

Das so hergestellte Nukleotidkonstrukt wird in den pGL3 Plasmidvektor (Promega; Madison, USA) einkloniert, die direkt oder in kolloidalen Dispersionssystemen für eine in vivo Applikation genutzt wird.

Die Funktionsweise der gesamten Aktivator-responsiven Promotoreinheit ist wie folgt:

Der Promotor Cyclin A reguliert zellzyklusspezifisch die Transkription der kombinierten cDNAs für die Aktivierungsdomäne von VP16 und den mutierten leucine Zipper von c-jun (Aktivierungsuntereinheit A) (Fig. 3)

Der Promotor Tyrosinase beschränkt die Transkription der kombinierten cDNAs für die Gal4-Bindungsdomäne, das NLS von SV40 und den mutierten leucine Zipper von c-fos auf Melanomzellen (Aktivierungsuntereinheit B) (Fig. 3).

Das dimere Protein stellt einen chimären Transkriptionsfaktor für den Aktivator-responsiven Promotor (DNA-Sequenz für die Gal4-Bindedomäne/SV40 Promotor) und für die Transkription des Effektorgenes (= Reportergen = Luciferasegen) dar (Fig. 5).

### Die Herstellung des Konstruktes

Die Verknüpfung der einzelnen Bestandteile des Konstruktes und die Einfügung in ein Plasmid (pGL3, Promega, Madison WI USA) (Figur 6) erfolgt über geeignete Restriktionsstellen, die über PCR-Amplifikation an den Termini der verschiedenen Elemente mitgeführt werden. Die Verknüpfung erfolgt mit Hilfe von dem Fachmann bekannten, für die Restriktionsstellen spezifischen Enzyme und DNA-Ligasen. Diese Enzyme sind käuflich zu erwerben.

Mit den beschriebenen Plasmiden werden in Kultur gehaltene Tumorzellen (MeWo: Humanmelanom Zellen, PC3: Humanprostate Zellen) mit dem Fachmann bekannter Methode DOTAP (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) transfiziert und die Menge an Luciferase produziert von den Zellen gemessen (Herber et al., *Oncogene* 9, 1295 (1994); Lucibello et al., *EMBO J.* 14, 132 (1995) und Jérôme et al., *Hum. Gen. Ther.*, *im Druck* (1998)).

Zur Überprüfung der Zellzyklusspezifität werden die Tumorzellen durch Entzug von Methionin über 48 Stunden in G0/G1 synchronisiert. BrdU-Einbau zeigt, daß sich MeWo und PC3 Zellen nach Methionientzug synchronisieren lassen (Jérôme et al., *Hum. Gen. Ther.*, *in press* (1998)).

## Ergebnisse

Folgende Ergebnisse werden erzielt: in transfizierten MeWo und PC3 Zellen kann eine deutliche Zunahme der Luciferase im Vergleich mit nichttransfizierte Tumorzellen ermittelt werden (Tabellen 2 und 3).

Proliferierende MeWo (DNA>2S) bilden deutlich mehr Luciferase als in G0/G1 synchronisierte Tumorzellen (DNA = 2S) und als proliferierende PC3 Zellen (Tabellen 2 und 3).

Die Aktivatorsubeinheiten A und B, die mutierte leucine Zipper enthalten, können nicht mit den endogenen c-fos und c-jun binden (Tabelle 2).

Die Aktivatorsubeinheiten A und B, die mutierten leucine Zipper enthalten, sind durch die starke Bindung von dem mutierten c-fos leucine Zipper an den mutierten c-jun leucine Zipper wirksamer als das System mit CD4 und LCK (Tabelle 2), im Detail beschrieben in der Patentanmeldung EP-A 0 805 209.

Somit führt die beschriebene Aktivator-responsive Promotoreinheit zu einer zellspezifischen, zellzyklusabhängigen Expression des Gens Luciferase (Tabelle 4).



## Weitere Ergebnisse mit dem Fos/jun-System

Die Aktivität des neuen komplexbildenden Proteins in Melanom- und Lungenkarzinomxenotransplantaten

Melanomxenotransplantate wurden durch intradermale Injektion von  $10^6$  MeWo-Zellen in Nacktmäuse eingebracht.

Lungenkarzinomxenotransplantate wurden durch subkutane Injektion von  $2 \cdot 10^7$  H322-Zellen (H3 22, bronchoalveoläre Karzinome, menschliche ATCC Nr. CRL 5806) in Nacktmäuse eingebracht.

Wenn die Xenotransplantate eine Größe von 4 mm erreichten, wurden sie mit folgender Plasmidkombination in einer Trägerlösung von 5 % Glukose, 0,01 % Triton X100 intratumoral coinjiziert.

Plasmidkombination:

- 6 ng des pRL-SV40 Vektors (Promega, Incorporated)  
+ 30 µg des pGL3-Promotor-Vektors (Promega, Incorporated)
- 6 ng des pRL-SV40 Vektors (Promega, Incorporated)  
+ 15 µg 10 x BS Gal4-SV40-luc + 15 µg des Tyr-m-fos-CycA-VP16
- 6 ng des pRL-SV40 Vektors (Promega, Incorporated)  
+ 15 µg 10 x BS Gal4-SV40-luc + 15 µg Tyr-m-fos-CycA-VP16-m-jun.

Alle diese Plasmide wurden mit dem endofreien QIAGEN Plasmid Maxi Kit (QIAGEN Inc.) isoliert.

Der pRL-SV40-Vektor wurde als interne Kontrolle verwendet, um die Ergebnisse der verschiedenen Xenotransplantate zu standardisieren.

24 h nach der Injektion wurden die Mäuse getötet, die Tumoren wurden herauspräpariert und mechanisch zerkleinert, und die Luciferaseaktivität im Lysat wurde mit Hilfe des Dual-Luciferase Reporter-Gen-Assay-Systems (Promega,

Incorporated) gemessen. Die Ergebnisse wurden als Verhältnis der Leuchtkäfer-Luciferaseaktivität zur pRL-SV40-Aktivität angegeben und auf die Proteinkonzentration übertragen.

Ergebnisse (siehe Tabelle 5):

1. In beiden Xenotransplantattypen, dem Melanom- und dem Lungenkarzinom-xenotransplantat, führt der konstitutiv exprimierte Promotor SV40 (pGL3-Promotor-Konstrukt) zum Nachweis der Leuchtkäfer-Luciferaseaktivität.
2. In beiden Xenotransplantattypen wurde nach der Injektion von 15 µg 10xBS Gal4-SV40-luc + 15 µg Tyr-m-fos-CycA-VP16 keine Leuchtkäfer-Luciferaseaktivität festgestellt.
3. Leuchtkäfer-Luciferaseaktivität wurde nur in Melanomxenotransplantaten nach der Injektion von 15 µg 10xBS Gal4-SV40-luc + 15 µg Tyr-m-fos-CycA-VP16-m-jun festgestellt. Das zeigt, daß das fos-jun-System eine selektive Expression der Luciferaseaktivität im Melanomxenotransplantat bewirkt.

Die durch das fos/jun-System gesteuerte Expression eines Effektorgens hat einen biologischen Effekt

Zur Analyse der Fähigkeit des fos/jun-Systems, eine biologische Wirkung hervorzurufen, wurde die Reporter-gen-Luciferase durch Bax cDNA (Oltvai et al., 1993) ersetzt. Um die transfizierten Zellen analysieren zu können, wurden die Zellen mit CMV-luc cotransfiziert. Eine große Menge Luciferase wurde konstitutiv exprimiert, die mit einem Luciferase-Assay leicht meßbar ist, so daß der Prozentsatz der überlebenden transfizierten Zellen berechnet werden kann.

Die MeWo (menschlichen Melanom-) und die H322 (bronchoalveolären Lungenkarzinom-) Zelllinien wurden, wie vom Hersteller beschrieben, mit Lipofectin (Gibco BRL Inc.) bzw. DOTAP (Boehringer Mannheim Inc.) transfiziert. Die Zellen wurden mit den folgenden Plasmiden cotransfiziert:

pCDNA3 (Invitrogen Inc.; Kontrolle): 1 ng CMV -luc + 1 µg Tyr-m-fos-CycA-VP16 + 1 µg pCDNA3

CMV-bax (Bax cDNA, kloniert in pCDNA3): 1 ng CMV-luc + 1 µg Tyr-m-fos-CycA-VP16-m-jun + 1 µg CMV-bax

pBax (Kontrolle): 1 ng CMV-luc + 1 µg Tyr-m-fos-CycA-VP16 + 1 µg pBax

10xBS Gal4-SV40-bax: 1 ng CMV-luc + 1 µg Tyr-m-fos-CycA-VP16-m-jun + 1 µg 10xBS Gal4-SV40-bax.

Die im Falle der Cotransfektion mit pCDNA3 und pBax (Kontrollplasmide, die keine Bax cDNA exprimieren) gemessenen Luciferasewerte wurden als 100 % Überleben der transfizierten Zellen angenommen.

48 h nach der Transfektion wurden die Zellen gesammelt und die Luciferaseaktivität wurde gemessen.

Ergebnisse (siehe Tabelle 6)

1. Wenn die Bax cDNA vom konstitutiven CMV-Promotor gesteuert wurde, ging der Prozentsatz der überlebenden transfizierten Zellen in beiden Zelltypen zurück, auf 9-10 % bei MeWo-Zellen und auf 32-36 % bei H322-Zellen.
2. Wenn die Bax cDNA durch den 10xBS Gal4-SV40-Promotor gesteuert wurde, betrug der Prozentsatz der überlebenden transfizierten Zellen 100 %, wenn die Me Wo-Zellen mit dem Kontrollplasmid (Tyr-m—fos-CycA-VP16) cotransfiziert wurden und ging auf 36 % zurück, wenn Tyr-m-fos-CycA-VP16-m-jun verwendet wurde. In den H3 22-Zellen betrug in beiden Fällen der Prozentsatz der überlebenden transfizierten Zellen 100 %.

Diese Ergebnisse zeigten, daß die Aktivierung des fos-jun-Systems in Melanomen ausreicht, um einen biologischen Effekt (Zellabtötung) hervorzurufen, was bei Nicht-Melanomzellen nicht festzustellen ist.

#### Selektive Expression des fos-jun-Systems in Melanomen nach der Übertragung des Adenovirus

Die Tyr-m-fos-CycA-VP16, Tyr-m-fos-CycA-VP16-m-jun und die 10 x BS Gal4-SV40-luc-Transkriptionskassetten wurden mittels bakterieller Rekombination, wie von He et al. (1998) beschrieben, in einem humanen E1/E3-deletierten Adenovirus (Serotyp 5) kloniert.

Die MeWo- und H322-Zellen wurden 6 Stunden lang entweder mit

AdTyr-m-fos-CycA-VP16+ Ad10xBS Gal4-SV40-luc oder mit

AdTyr-m-fos-CycA-VP16-m-jun + Ad10xBS Gal4-SV40-luc

coinfiziert, und die Luciferaseaktivität wurde 48 h nach der Infektion gemessen.

Die Aktivitäten in beiden Zelllinien wurden mit den Ergebnissen verglichen, die mit AdSV40-luc (humanes E1/E3-deletiertes Adenovirus (Serotyp 5) mit einem SV40-Promotor (-138/+45), D.M. Nettelbeck, unveröffentlichte Daten) erzielt wurden.

Ergebnisse (siehe Tabelle 7):

In beiden Zelllinien führte die Coinfektion mit dem Kontroll-Adenovirus (AdTyr-m-fos-CycA-VP16) zu einer schwachen Expression der Luciferaseaktivität, während eine hohe Aktivität, das 70-fache der mit AdSV40-luc gemessenen, nur in MeWo-Zellen nach der Infektion mit AdTyr-m-fos-CycA-VP16-m-jun festgestellt wurde.

Die selektive Expression des fos-jun-Systems in Melanomen wird nach der Übertragung des fos-jun-Systems auf einen Adenovirus-Vektor aufrechterhalten.

**Figurenlegende:**

- Fig. 1:       (a)    Schematische Darstellung der neuen komplexbildenden Proteine, Möglichkeit 1  
              (b)    Variante der Möglichkeit 1
- Fig. 2:       Schematische Darstellung der neuen komplexbildenden Proteine, Möglichkeit 2.
- Fig. 3:       Aktivatorresponsive Promotoreinheiten A und B gemäß den Beispielen.
- Fig. 4:       Mutationen von c-jun und c-fos gemäß den Beispielen.
- Fig. 5:       Der Aktivator responsive Promotor und das Effektorgen.
- Fig. 6:       Nukleinsäurekonstrukte zur Expression der erfindungsgemäßen komplexbildenden Proteine.

Tabelle 1

Protein-Protein-Interaktion nach Immunprecipitation

(S35)-Methionin markierte Proteine	Nicht radioaktive Proteine	Interaktionsfähigkeit
Aktivierungsdomäne von VP16	wt-fos-Gal4	-
wt-jun-VP16	wt-fos-Gal4	+++
m-jun-VP16	wt-fos-Gal4	-
VP16	m-fos-Gal4	-
wt-jun-VP16	m-fos-Gal4	-
m-jun-VP16	m-fos-Gal4	++++

Tabelle 2

## Luciferase Aktivitäten in MeWo Zellen

Transfizierte Plasmide		Luciferase Werte (RLU)	
(Aktivator-responsive) Promotoren im pGL-3 Plasmid	Aktivatorsubeinheiten im pGL3 Plasmid	G0/G1-synchronisierte Zellen	proliferierende Zellen
-	-	185	210
SV40	-	6240	28416
CycA	-	4312	223743
Tyrp	-	149104	719672
10x BS Gal4-SV40	CycA-VP16 + Tyr-m-fos-Gal4	163	382
10xBS Gal4-SV40	CycA-m-jun-VP16 + Tyr-m-fos-Gal4	271	18324
10xBS Gal4-SV40	CycA-wt-jun-VP16 + Tyr-m-fos-Gal4	283	284
10xBS Gal4-SV40	CycA-m-jun-VP16 + Tyr-wt-fos-Gal4	224	290
10xBS Gal4-SV40	Tyr-m-fos-CycA-VP16	1103	9445
10xBS Gal4-SV40	Tyr-m-fos-CycA-m-jun	12665	1019337
10xBS Gal4-SV40	Tyr-LCK-Gal4-CycA-VP16	4283	4997
10xBS Gal4-SV40	Tyr-LCK-Gal4-CycACD4-VP16	5994	72435

Tabelle 3

Luciferase Aktivitäten in PC3 Zellen

Transfizierte Plasmide		Luciferase Werte (RLU)	
(Aktivator-responsive) Promotoren im PGL3-Plasmid	Aktivatorsubeinheiten im PGL3- Plasmid	G0/G1-synchronisierte Zellen	proliferierende Zellen
-	-	1393	2114
SV40	-	27458	40818
CycA	-	5835	131615
10x BS Gal4-SV40	Tyr-m-fos-CycA-VP16	4097	6293
10x BS Gal4-SV40	Tyr-m-fos-Gal4-CycA-m-jun-VP16	8820	11556



Tabelle 4

Zellspezifische, zellzyklusabhängige Expression des Luciferasegens

Transfizierte Plasmide		RLU Verhältnis (proliferierende gegen synchronisierte Zellen)	
(Aktivator-responsive) Promotoren im pGL3-Plasmid	Aktivatorsubeinheiten im pGL3-Plasmid	MeWo Melanom	PC3 Prostata Karzinom
-	-	0,25	1
SV40	-	1	1
CycA	-	11,4	15,2
Tyrp	-	1,1	n.d.
10xBS Gal4-SV40	CycA-VP16 + Tyr-m-fos-Gal4	0,5	1
10xBS Gal4-SV40	CycA-m-jun-VP16 + Tyr-m-fos-Gal4	14,8	0,9
10xBS Gal4-SV40	CycA-wt-jun-VP16 + Tyr-m-fos-Gal4	0,22	n.d.
10xBS Gal4-SV40	CycA-m-jun-VP16 + Tyr-wt-fos-Gal4	0,3	n.d.
10xBS Gal4-SV40	Tyr-m-fos-CycA-VP16	1,9	1
10xBS Gal4-SV40	Tyr-m-fos-Gal4- CycA-m-jun-VP16	17,7	0,9
10xBS Gal4-SV40	Tyr-LCK-Gal4- CycA-VP16	0,26	1,2
10xBS Gal4-SV40	Tyr-LCK-Gal4- CycA-CD4-VP16	2,6	1,7

Tabelle 5

Luciferaseaktivitäten in Melanom- und Lungenkarzinomxenotransplantaten

Injiziertes Plasmid			Verhältnis (Leuchtkäfer-luciferase/pRL-SV40)/mg Protein	
Interne Kontrolle Plasmid	Promotor in pGL3 (auf Aktivator reagierend)	Aktivator-untereinheiten in pGL3	Melanomxeno-transplantat -	Lungenkarzinom-xenotransplantat
pRL-SV40	SV40		10,9 ± 3,6	5,1 ± 0,4
pRL-SV40	10xBS Gal4-SV40	Tyr-m-fos-CycA-VP16	0,5 ± 0,3	0,017 ± 0,005
pRL-SV40	10xBS Gal4-SV40	Tyr-m-fos-CycA-VP16-m-jun	31,8 ± 7,8	0,8 ± 0,4

Für Standardabweichung n = 5

Tabelle 6

Prozentsatz überlebender transfizierter Zellen bei MeWo- und H322-Zellen

Alle Zellen wurden mit 1 ng CMV-luc als "Marker" der transfizierten Zellen cotransfiziert.

Transfiziertes Plasmid		% überlebende transfizierte Zellen	
(auf Aktivator reagierender) Promotor für die Expression von Bax cDNA	Aktivatoruntereinheiten in pGL3	MeWo	H322
CMV	Tyr-m-fos-CycA-VP16	9	36
CMV	Tyr-m-fos-CycA-VP16-m-jun	9,5	32
10 x BS Gal4-SV40	Tyr-m-fos-CycA-VP16	100	100
10 x BS Gal4-SV40	Tyr-m-fos-CycA-VP16-m-jun	36	100

Tabelle 7

Selektive Genexpression in Melanomen nach der Adenovirusübertragung

Für die Infektion verwendetes Virus		Luciferaseaktivität (RLU)	
(auf Aktivator reagierender) Promotor in AD5	Aktivatorunterein- heiten in AD5	MeWo	H322
AdSV40-luc	-	2692	1733
Ad10xBS Gal4- SV40-luc	ADTyr-m-fos- CycA- VP16	1053	563
Ad10xBS Gal4- SV 40-luc	AdTyr-m-fos-CycA- VP16-m-jun	186217	475

## Patentansprüche:

1. Komplex aus nicht natürlich vorkommenden, spezifisch komplexbildenden Proteinen, dadurch gekennzeichnet, daß folgende Komponenten im Komplex enthalten sind:
  - a) mindestens ein für eine Zielstruktur spezifischer Ligand,
  - b) mindestens ein Protein enthaltend eine mutierte Dimerisierungsdomäne, wobei die mutierte Dimerisierungsdomäne durch Mutierung von einer natürlich vorkommenden Dimerisierungsdomäne abgeleitet worden ist, diese mutierte Dimerisierungsdomäne spezifisch mit Komponente c) wechselwirken kann und die Komponente b) kovalent mit der Komponente a) verbunden ist,
  - c) mindestens ein Protein enthaltend eine mutierte Dimerisierungsdomäne, wobei die mutierte Dimerisierungsdomäne durch Mutierung von einer natürlich vorkommenden Dimerisierungsdomäne abgeleitet worden ist, diese mutierte Dimerisierungsdomäne spezifisch mit Komponente b) wechselwirken kann und die Komponente c) kovalent mit der Komponente d) verbunden ist, und
  - d) mindestens einen Effektor.
2. Komplex gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Komponente a) ersetzt ist durch die Komponente d).
3. Komplex gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Komponente d) ersetzt ist durch die Komponente a).

4. Komplex gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß er zusätzlich ein fusiogenes Peptid oder ein Translokalisationspeptid enthält.
5. Komplex gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß er zwischen den Komponenten c) und d) oder a) und b) eine Spaltsequenz für eine Protease enthält.
6. Komplex gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 dadurch gekennzeichnet, daß der Ligand (Komponente a) ausgewählt ist aus einer Gruppe enthaltend einen Wachstumsfaktor, ein Cytokin, TNF, ein Chemokin, ein Peptidhormon, ein Mediator, ein Steroidhormon, ein Vitamin, einen Komplementfaktor, einen Gerinnungsfaktor, einen Faktor des Kininsystems oder des Fibrinolysesystems, ein plasmatisches oder zelluläres Enzym, einen plasmatischen oder zellulären Enzyminhibitor, eine Virushüllprotein, einen zellulären Rezeptor für einen der zuvor aufgeführten Proteine und Wirkstoffe, einen Antikörper, ein Antikörperspaltprodukt wie F(ab)<sub>2</sub>, ein einzelkettiges Fv, ein einzelkettiges, doppelantigenbindendes Molekül, ein Fc-Fragment, ein DNA-Bindeprotein, die DNA-Bindedomäne eines Transkriptionsfaktors und die Aktivierungsdomäne eines Transkriptionsfaktors.
7. Komplex gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 dadurch gekennzeichnet, daß die Komponenten b) und c) von natürlich sich miteinander verbindenden Proteinen abgeleitet werden.
8. Komplex gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die natürlich sich miteinander verbindenden Proteine ausgewählt werden aus einer Gruppe von natürlichen Dimerisierungspartnern enthaltend:

Fos	Jun oder Jun B oder Jun D
FRAU-1	Jun oder Jun B oder Jun D
FRAU-2	Jun oder Jun B oder Jun D
FOS-B	Jun oder Jun B oder Jun D

OCT-1	Jun oder Jun B oder Jun D
NFKB (p65)	IKB
Ras	RAF
CD4	p56LcK
bcl-2	bad oder bax
Cyclin A	cdk1
E2F	DP
CD40	CD40L
Myc	Max
Myc N	Max
Myc L	Max
p105 (Rb1)	AFF-2, E1A
p107 (Rb2)	E7, E2F oder Myc
p130	E7, E2F oder Myc
CBL	Gag
TRP	TRP
Met	Met
Myb	p67 oder p160
VAV	p67 oder p160
APC	$\alpha$ - oder $\beta$ -Catenin
APC	APC
VD Rezeptor	h-(Retinoid x-Rezeptor)RXR
	$\alpha$ oder $\beta$
T3 Rezeptor	HRXR $\alpha$ oder $\beta$
MyoD	E12
E12	Id
E47	Id
HHSP90	Progesteron-Rezeptor
HHSP90	Glucocorticoid-Rezeptor
HHSP90	Mineralocorticoid-Rezeptor
HHSP90	Dioxinrezeptor
Dioxinrezeptor	Arnt

HPS90	FKBP59
HSP90	Cyclosporin-bindendes Protein
HPS90	Pp60 <sup>V-src</sup>
HSP70	HSF1 Heat shock Faktor 1
HSP70	HSF2 Heat shock Faktor 2

9. Komplex gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die natürlich sich miteinander verbindenden Proteine, der Helix-Loop-Helix/Leucin-Zipper Familie angehören.
10. Komplex gemäß einem der Ansprüche 7 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Mutationen der Dimerisierungsdomänen der Komponenten b) und c) erfolgt sind durch Einführung von
  - 3 - 18 Cysteinen in die jeweils zugrundeliegenden natürlich vorkommenden Dimerisierungsdomänen;
  - 3 - 24 basischen Aminosäuren in jeweils eine der zugrundeliegenden, natürlich vorkommenden Dimerisierungsdomänen und von 3 - 24 sauren Aminosäuren in jeweils die andere der zugrundeliegenden, natürlich vorkommenden Dimerisierungsdomänen;
  - 3 - 24 hydrophoben Aminosäuren in jeweils eine der zugrundeliegenden, natürlich vorkommenden Dimerisierungsdomänen und von 3 - 24 aromatischen Aminosäuren in jeweils die andere der zugrundeliegenden, natürlich vorkommenden Dimerisierungsdomänen; und/oder
  - 3 - 24 aromatischen Aminosäuren in jeweils eine der zugrundeliegenden, natürlich vorkommenden Dimerisierungsdomänen und von 3 - 24 aromatischen Aminosäuren in jeweils die andere der zugrundeliegenden, natürlich vorkommenden Dimerisierungsdomänen.

11. Komplex nach Anspruch 10, bei welchen die Komponenten b) und c) die mutierten Bindedomänen von c-fos und c-jun darstellen, wobei folgende Mutationen vorliegen:

c-fos Aminosäure 167E → K

172E → K

181E → K

c-jun Aminosäure 283K → E

288 K → E

302K → E

12. Komplex nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch charakterisiert, daß die Komponente d) ausgewählt ist aus einer Gruppe umfassend Inhibitoren der Zellproliferation, Apoptose induzierende Proteine, zytostatische oder zytotoxische Proteine, Gerinnung induzierende Faktoren, Angiogenese induzierende Faktoren, Angiogenese hemmende Faktoren, Wachstumsfaktoren, Cytokine, Chemokine, Interleukine, Interferone, Komplementfaktoren, Gerinnungsfaktoren, Fibrinolyse induzierende Proteine, Peptidhormone, Mediatoren, bakterielle Proteine, Rezeptoren (für Wachstumsfaktoren, Cytokine, Chemokine, Interleukine, Interferone, Komplementfaktoren, Gerinnungsfaktoren, Fibrinolyse induzierende Proteine, Peptidhormone, Steroidhormone, Mediatoren oder Virushüllproteine), virale Antigene, parasitäre Antigene, Tumorantigene, Autoantigene, Gewebsantigene, Adhäsionsmoleküle, Antikörper oder Antikörperspaltprodukte wie F(ab)<sub>2</sub>, Fab, einzelkettiges Fv, einzelkettige doppelantigenbindende Proteine, Enzyme zur Umsetzung einer signalgebenden Komponente, Enzyme zur Überführung einer Vorstufe einer Wirksubstanz in eine Wirksubstanz, Fluoreszenzfarbstoffe, Isotope, metallbindende Proteine, eine DNA-Bindedomäne.
13. Verwendung eines Komplexes nach einem der Ansprüche 1 bis 12 zur Herstellung eines Heilmittels zur Behandlung von Entzündungen,

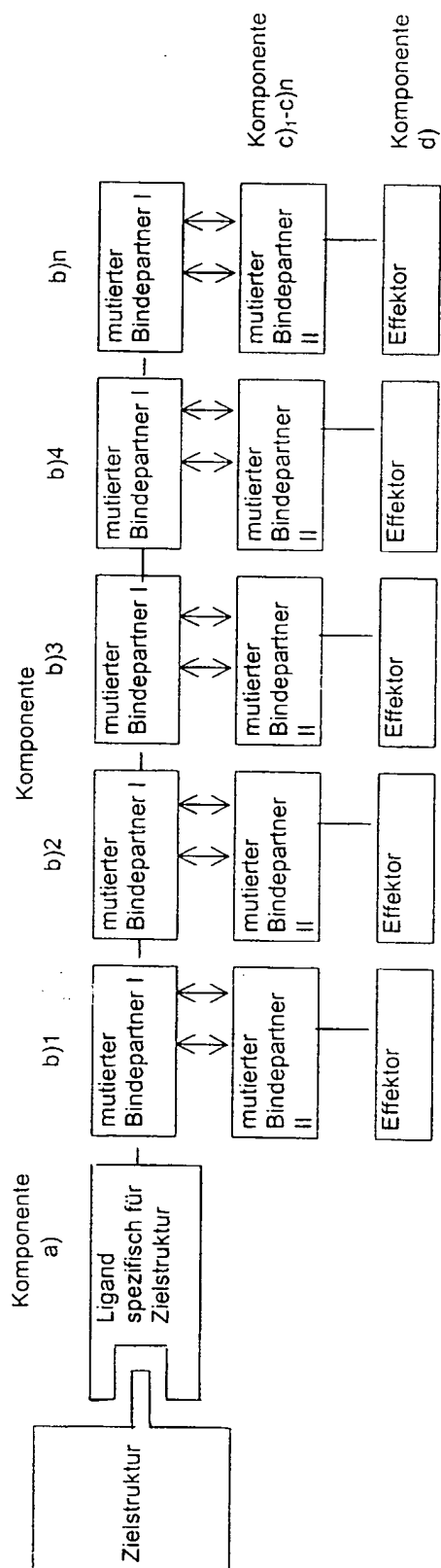


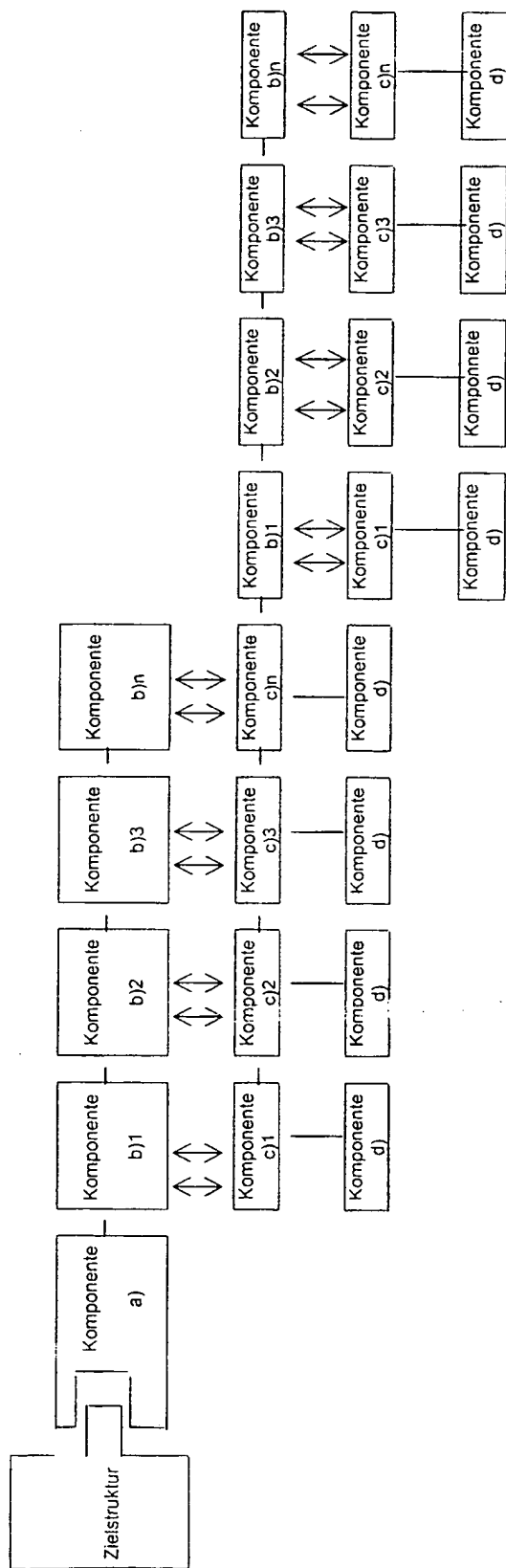
Autoimmunerkrankungen, mangelhafter Bildung von Zellen des Blutes, Schäden des Nervensystems, Störungen des Blutgerinnungs- und Blutkreislaufsystems, Tumoren, viralen- und bakteriellen Infektionen und zur Herstellung eines Impfstoffes.

14. Verwendung eines Komplexes nach einem der Ansprüche 1 bis 12 für die Komplexierung mit einem viralen oder nicht viralen Vektor und zur zielzellspezifischen Einführung dieses Vektors in die Zelle eines Organismus oder einer Zellkultur.
15. Verwendung eines Komplexes nach einem der Ansprüche 1 bis 12 für den Nachweis eines Reaktionspartners in vitro oder in vivo.
16. Nukleinsäurekonstrukt kodierend für ein Protein nach Ansprüchen 1 bis 12.
17. Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 16, kodierend für die Aktivatorsubeinheiten einer Aktivator-responsiven Promotoreinheit.
18. Wirtszelle enthaltend ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß dem Anspruch 16 oder 17.
19. Wirtszelle gemäß Anspruch 18 ausgewählt aus einer Gruppe enthaltend ein Bakterium, eine Hefe und eine Säugerzelle.
20. Verwendung einer Wirtszelle gemäß einem der Ansprüche 18 und 19 zur Herstellung der Komplexe gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12.
21. Herstellung eines Komplexes nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß
  - (a) ein Protein des Komplexes nach einem der Ansprüche 1 bis 12 mit Hilfe eines Nukleinsäurekonstrukts nach einem der Ansprüche 16 oder 17 exprimiert wird,

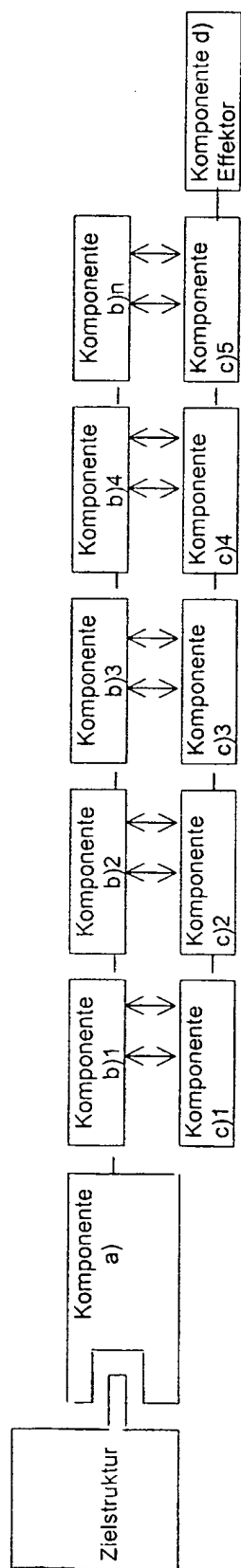
- (b) ein weiteres, von dem unter (a) beschriebenen Protein verschiedenes Protein des Komplexes nach einem der Ansprüche 1 bis 12 mit Hilfe eines Nukleinsäurekonstrukts nach einem der Ansprüche 16 oder 17 exprimiert wird,
- (c) die Proteine aus den Schritten (a) und (b) isoliert und
- (d) miteinander komplexiert werden.

# Neue komplexbildende Proteine Möglichkeit 1





Neue komplexbildende Proteine  
Möglichkeit 2



## Aktivatorsubeinheit A

Cyclin A Promotor NS -214 bis +100	NLS (SV40) aa 126-132	TAD (VP16) aa 411-455	c-jun (mutiert) aa 276-312
--	-----------------------------	-----------------------------	----------------------------------

## Aktivatorsubeinheit B

Tyrosinpromotor [NS -2014 bis -1820] <sub>2x</sub> NS -209 bis +51	NLS (SV40) aa 126-132	DB (Gal4) aa 1-147	c-fos (mutiert) aa 160-196
--	-----------------------------	-----------------------	----------------------------------

## Mutationen von c-jun (Zipper)

Wildtyp (wt) RIARLEEKVKTLLKAQNSELASTANMLREQVAQLKQKV (SEQ ID NO.: 22)  
(aa276-312)

mutiert (m)

↓                      ↓                      ↓  
(E)                      (E)                      (E)  
283                      288                      302

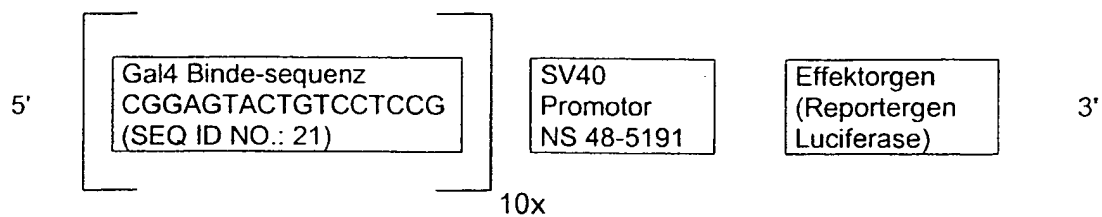
## Mutationen von c-fos (Zipper)

Wildtyp (wt) LTDTLQAETDQLEDEKSALQTEIANLLKEKEKLEFIL (SEQ ID NO.: 23)  
(aa160-196)

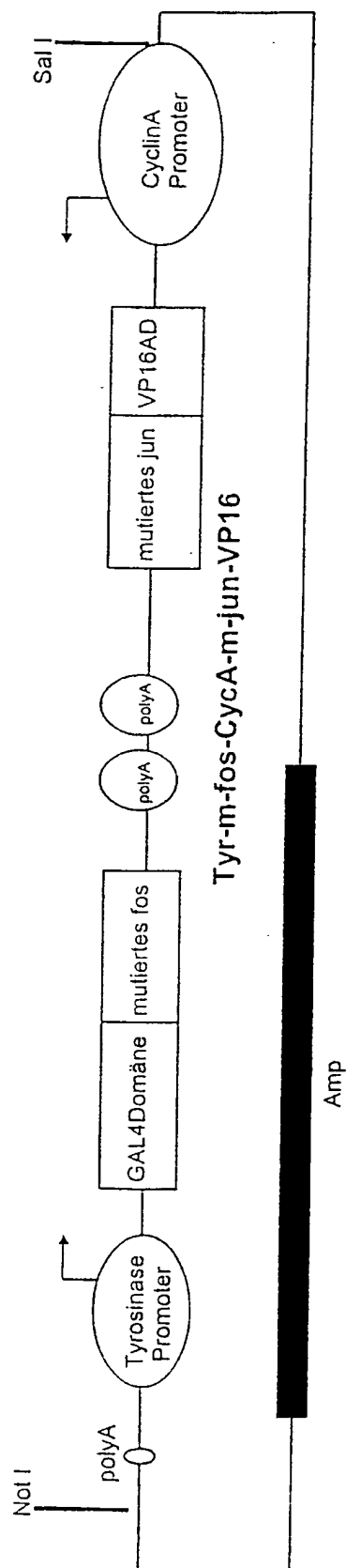
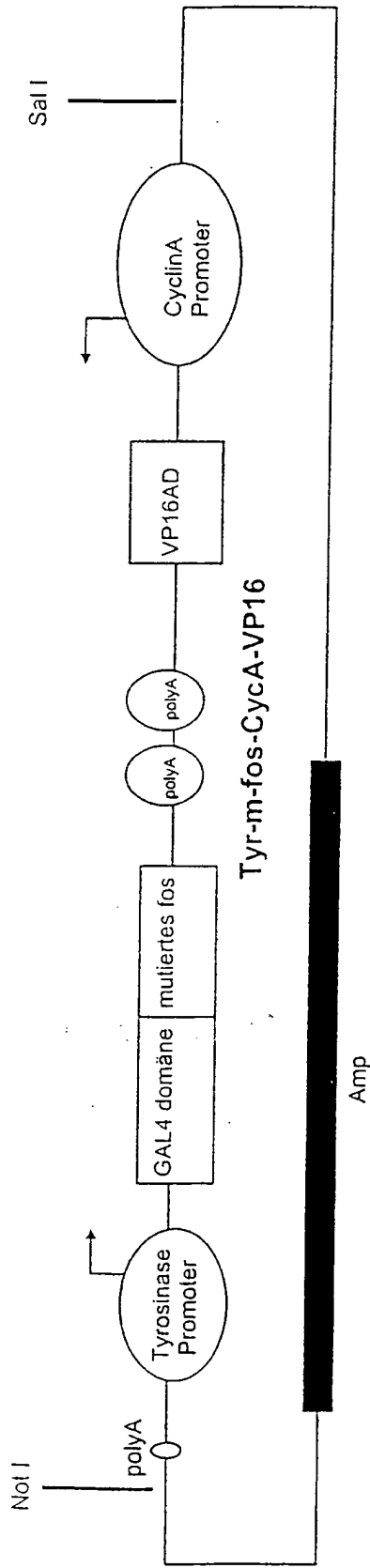
mutiert (m)

↓                      ↓                      ↓  
(K)                      (K)                      (K)  
167                      172                      181

Der Aktivator-responsive Promotor und das Effektorgen







## SEQUENZPROTOKOLL

<110> Hoechst Marion Roussel Deutschland GmbH

<120> Neue komplexbildende Proteine

<130> HMR 1999/L 001

<140> 199 00 743.8

<141> 1999-01-12

<160> 21

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> künstlich

<400> 1

Gly Leu Phe Glu Ala Leu Leu Glu Leu Leu Glu Ser Leu Trp Glu Leu  
1 5 10 15

Leu Leu Glu Ala  
20

<210> 2

<211> 29

<212> PRT

<213> künstlich

<400> 2

Ala Ala Leu Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ala Leu Ala  
1 5 10 15

Glu Ala Leu Ala Glu Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Cys  
20 25

<210> 3

<211> 19

<212> PRT

<213> künstlich

<400> 3

Phe Ala Gly Val Val Leu Ala Gly Ala Ala Leu Gly Val Ala Ala Ala  
1 5 10 15

Ala Gln Ile

<210> 4

<211> 20

<212> PRT

<213> künstlich

&lt;400&gt; 4

Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Trp Gly  
1 5 10 15

Met Ile Asp Gly  
20

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; künstlich

&lt;400&gt; 5

Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly  
1 5 10 15

Met Ile Asp Gly Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Asn  
20 25 30

Gly Trp Glu Gly Met Ile Asp Gly  
35 40

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; künstlich

&lt;400&gt; 6

Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu  
1 5 10

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; künstlich

&lt;400&gt; 7

Ala Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu  
1 5 10

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; künstlich

&lt;400&gt; 8

Leu Phe Leu Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu  
1 5 10

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; künstlich

<400> 9  
Leu Leu Leu Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu  
1 5 10

<210> 10  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> künstlich

<400> 10  
Leu Ile Leu Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu  
1 5 10

<210> 11  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> künstlich

<400> 11  
Gly Ile Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu  
1 5 10

<210> 12  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> künstlich

<400> 12  
Gly Leu Leu Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu  
1 5 10

<210> 13  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> künstlich

<400> 13  
Gly Leu Phe Ala Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu  
1 5 10

<210> 14  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> künstlich

<400> 14  
Gly Leu Phe Glu Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu  
1 5 10

<210> 15  
<211> 11  
<212> PRT

<213> künstlich

<400> 15

Gly Leu Phe Gly Ala Met Ala Gly Phe Ile Glu  
1 5 10

<210> 16

<211> 11

<212> PRT

<213> künstlich

<400> 16

Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Leu Ile Glu  
1 5 10

<210> 17

<211> 11

<212> PRT

<213> künstlich

<400> 17

Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Val  
1 5 10

<210> 18

<211> 20

<212> PRT

<213> künstlich

<400> 18

Gly Leu Phe Glu Ala Ile Ala Glu Phe Ile Glu Gly Gly Trp Glu Gly  
1 5 10 15

Leu Ile Glu Gly  
20

<210> 19

<211> 20

<212> PRT

<213> künstlich

<400> 19

Gly Leu Leu Glu Ala Leu Ala Glu Leu Leu Glu Gly Gly Trp Glu Gly  
1 5 10 15

Leu Leu Glu Gly  
20

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> SV 40

<400> 20

Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val

<210> 21  
<211> 17  
<212> DNA  
<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 21  
cggagtactg tcctccg

17